

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-506420

(P2004-506420A)

(43) 公表日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
<b>C O 7 K 14/47</b>	C O 7 K 14/47	4 B O 6 3
<b>C O 7 K 16/18</b>	C O 7 K 16/18	4 B O 6 4
<b>C 1 2 P 21/08</b>	C 1 2 P 21/08	4 H O 4 5
<b>C 1 2 Q 1/68</b>	C 1 2 Q 1/68	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 122 頁)		

(21) 出願番号 特願2002-518256 (P2002-518256)  
 (86) (22) 出願日 平成13年8月6日 (2001.8.6)  
 (85) 翻訳文提出日 平成15年1月30日 (2003.1.30)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/024747  
 (87) 国際公開番号 W02002/012284  
 (87) 国際公開日 平成14年2月14日 (2002.2.14)  
 (31) 優先権主張番号 60/222,863  
 (32) 優先日 平成12年8月4日 (2000.8.4)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503042820  
 ローマ リンダ ユニヴァーシティ メデ  
 イカル センター  
 アメリカ合衆国 92350 カリフォル  
 ニア州, ローマ リンダ, スイート  
 # A 1 1 1 6, キャンパス ストリート  
 1 1 1 7 6, コールマン パビリオン

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経変性疾患のための診断剤としての鉄調節タンパク質-2 (IRP-2)

## (57) 【要約】

本発明は、神経変性疾患についてのマーカーの発見に関する。特に、重要なシステイン残基で酸化を受け得ない IRP - 2 タンパク質の型が神経変性疾患 (アルツハイマー病 (AD) を含むが、これに限定されない) のための診断因子であることを見いだした。実施形態は、変異 IRP - 2 タンパク質およびそのフラグメントをコードする核酸、変異 IRP - 2 タンパク質およびそのフラグメント、変異 IRP - 2 タンパク質およびそのフラグメント上に存在するエピトープに関する抗体、これらの核酸を作製する方法、および動物 (AD または軽度認知障害症候群 (MCI) ) にかかる危険性のあるヒトのような) における神経変性疾患を診断するための方法を含む。ヒト脳における鉄の分布のレベルは、磁気共鳴画像法 (MRI) によって決定されるように、AD および / または MCI を診断するために使用され得る。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトに由来する野生型 I R P - 2 のアミノ酸残基 1 3 6 - 2 1 6 に相当するペプチドループをコードする配列を含む精製または単離された核酸であって、ここで前記配列が前記ペプチドループ内に変異を含み、ここで前記変異が前記ペプチドループ内に存在するシステイン残基の酸化を受ける能力を妨げる、核酸。

## 【請求項 2】

請求項 1 の精製または単離された核酸であって、前記核酸配列が配列番号 3、5、7、9、11、13、および 15 の少なくとも 1 つを含む、核酸。

## 【請求項 3】

請求項 1 の精製または単離された核酸であって、前記核酸配列が配列番号 4、6、8、10、12、14、および 16 から成る群より選択される配列を含むペプチドをコードする、核酸。

10

## 【請求項 4】

ヒトに由来する野生型 I R P - 2 のアミノ酸残基 1 3 6 - 2 1 6 に相当するペプチドループを含む精製または単離されたポリペプチドであって、ここで前記配列が前記ペプチドループ内に変異を含み、ここで前記変異が前記ペプチドループ内に存在するシステイン残基の酸化を受ける能力を妨げる、ポリペプチド。

## 【請求項 5】

請求項 4 の精製または単離されたポリペプチドであって、前記 I R P - 2 タンパク質が配列番号 4、6、8、10、12、14、および 16 から成る群より選択される配列を含む、ポリペプチド。

20

## 【請求項 6】

請求項 4 の精製または単離されたポリペプチドであって、前記 I R P - 2 タンパク質が配列番号 4、6、8、10、12、14、および 16 から成る群より選択される、ポリペプチド。

## 【請求項 7】

神経変性疾患の処置または予防を必要とする被験体を同定する方法であって、以下：  
ポリヌクレオチドまたはタンパク質を有する被験体から生物学的サンプルを得ること；  
プローブを提供すること、前記プローブは野生型または変異 I R P - 2 タンパク質と相互作用するプローブおよび野生型または変異 I R P - 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドと相互作用するプローブから成る群より選択される；  
該プローブが該生物学的サンプル中のポリヌクレオチドまたはタンパク質と相互作用する条件下において、該生物学的サンプルを該プローブと接触させること；  
該生物学的サンプル中のポリヌクレオチドまたはタンパク質と相互作用するプローブの量を検出すること；および  
該生物学的サンプル中のポリヌクレオチドまたはタンパク質と関係するプローブの存在または非存在を決定することによって、該被験体を神経変性疾患の処置または予防を必要とする被験体として同定すること、  
を包含する、方法。

30

40

## 【請求項 8】

請求項 7 の方法であって、該プローブが核酸、タンパク質および擬ペプチド ( p e p t i d e m i m e t i c ) から成る群より選択される、方法。

## 【請求項 9】

請求項 7 の方法であって、該ポリヌクレオチドまたはタンパク質と相互作用するプローブの量の検出が、蛍光活性化セルソーティング ( f l u o r e s c e n c e - a c t i v a t e d c e l l s o r t i n g ) ( F A C s )、免疫沈降、ウェスタンブロット、イムノクロマトグラフィー、抗体染色、およびハイブリダイゼーションアッセイから成る群より選択される技術の使用を包含する、方法。

## 【請求項 10】

50

請求項 7 の方法であって、前記神経変性疾患がアルツハイマー病である、方法。

【請求項 1 1】

神経変性疾患の診断のためのプローブを作製する方法であって、以下：

請求項 4 に記載のポリペプチドを提供すること；および

前記変異ポリペプチド上に存在するエピトープに結合する抗体を生成すること（ここで、前記抗体が野生型 I R P - 2 タンパク質またはそのフラグメントと交差反応しない）、を包含する、方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 1 の方法であって、前記変異がシステイン残基の置換または欠失を含む、方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 1 の方法であって、該生成工程が前記抗体を産生する細胞を培養することを包含する、方法。

【請求項 1 4】

配列番号 4、6、8、10、12、14、および 16 から成る群より選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的に結合し得る、抗体。

【請求項 1 5】

請求項 1 3 の抗体であって、前記抗体が前記タンパク質の少なくとも 10 個の連続するアミノ酸を含むポリペプチドに特異的に結合し、且つ該タンパク質がシステイン残基の変異を有する、抗体。

【請求項 1 6】

請求項 1 3 の抗体であって、前記抗体がモノクローナル抗体である、抗体。

【請求項 1 7】

変異 I R P - 2 タンパク質を特異的に結合し得るが野生型 I R P - 2 タンパク質を特異的には結合しない精製または単離された抗体であって、前記変異 I R P - 2 タンパク質が配列番号 2 のアミノ酸配列に相当するペプチドループ内に変異を含む、抗体。

【請求項 1 8】

請求項 7 の方法であって、神経変性疾患の処置または予防を必要とする被験体としての該被験体の同定が、該プローブが前記生物学的サンプル中のポリヌクレオチドまたはタンパク質と相互作用するか否かを決定することを包含する、方法。

【請求項 1 9】

ヒト患者において軽度認知機能障害症候群（M C I）を他の型の痴呆と区別する方法であって、以下：

該患者に対して磁気共鳴画像法（M R I）を行い、脳鉄を定量および／またはモニターすること；

を包含し、ここで脳鉄の異常なレベルまたは分布が M C I の存在を示す、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、神経変性疾患のためのマーカーの発見に関する。とりわけ、鉄調節タンパク質 2（I R P - 2）の形態は重要なシステイン残基で酸化を受け得ず、またアルツハイマー病を含むがこれに限定されない神経変性疾患のための診断剤であることが見出された。

【0002】

発明の背景

神経変性疾患は、世界中で数百万人の人々を苦しめている。例えばアルツハイマー病（A D）は、心臓疾患、癌、および脳卒中に続いてアメリカ合衆国で 4 番目に一般的な死因である。それは、現在、アメリカ合衆国内だけでも 400 万人以上の人々を苦しめ、またその数は、この集団が年を取るにつれて次の 40 年間の間に 2 倍になると予測される。高齢およびダウン症候群は別として、神経変性疾患の進行に関わる唯一の矛盾しない危険因子は、陽性家族病歴の存在であった。現在、研究者らは、神経変性疾患の一因となる病的遺伝子を同定するための遺伝連鎖解析（genetic linkage analysis）

10

20

30

40

50

s)を行っているが、しかしながら、これらの疾患の根元となる生化学的メカニズムの理解は依然として初期段階にある。

#### 【0003】

しかしながら最近、脳鉄調節 (brain iron regulation) における障害がいくつかの形態の神経変性疾患 (例えば、AD) の一因となるという疑いが強まってきた (Gerlachら、J. Neurochem. 63: 793 - 807 (1994))。脳では、鉄代謝が厳しく制御される。過剰な鉄は毒性をもたらす、少なすぎると代謝を損なう。全ての組織は、鉄調節タンパク質 1 (IRP-1) および鉄調節タンパク質 2 (IRP-2) の作用を介して鉄の取り込みを調節する。最近の知見は、これらの鉄調節タンパク質 (特に、IRP-2) が、アルツハイマー病に罹患する患者において観察される鉄ホメオスタシス障害に関係することが明らかにする。 (Smithら、Brain Research、788: 232 - 236 (1998))。

10

#### 【0004】

例えば、鉄欠乏細胞内で IRP-2 レベルにおける増加が観察される。この増加の結果として、IRP-2 はトランスフェリンレセプター (これは鉄取り込みを促進するタンパク質である) のための mRNA の 3' プライム非翻訳領域に結合する。さらに、IRP-2 は、結合を阻止するフェリチンをコードする HnRNA の 5' cap 構造への結合およびそれに続く翻訳を防止する。本質的に、鉄取り込みは高レベルな IRP-2 の存在によって促進される。一方、もし細胞が過剰量の鉄を提供されるならば、IRP-2 は迅速に分解され、そして鉄の取り込みが直ちに減少される。このように、IRP-2 の分解を調節することによって、体は鉄ホメオスタシスを達成する。 (Van Buskirkら、Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 722 - 725 (1984))。IRP-2 分解の誘導に関するより大きな理解が必要である。

20

#### 【0005】

MRI による脳鉄の定量に関する文献中に多数の報告がなされているが (Schefflerら、Magn Reson Med., 42(5): 829 - 36 (1999); Vymazalら、J Neurol Sci., 134 Suppl: 19 - 26 (1995); Quastら、Magn Reson Imaging, 11(4): 465 - 71 (1993))、普遍的に受け入れられる方法もしくは基準およびヒトに関して較正または実証されたデータは存在しない。例えば側頭葉および海馬の体積の変化率における差異を調べる連続的長期的な研究が、単発的な測定よりもより強力な診断上の助けとなることが立証されてきた。MR 画像化技術を用いて、側頭葉萎縮が AD 患者において連続的に追跡されてきた。量的かつ連続的に局部的脳鉄を評価する能力は、神経変性疾患を有する個体の予測処置の診断およびモニタリングの両方において潜在的な利用性を提供する。

30

#### 【0006】

鉄は、その常磁性形態において、MR 画像に及ぼす多大な影響を有する。影響としては、T2\* 強調グラディエントエコー画像中のマグニチュードおよび相画像におけるシグナル変化、T2 強調および拡散強調スピンエコー画像におけるシグナル変化、ならびに T1 強調画像におけるシグナル増加が挙げられる。鉄の含有率が高い灰白質において (例えば、中心溝において)、鉄は T1 低減造影剤 (T1 reducing contrast agent) のような挙動を示す。

40

#### 【0007】

脳鉄の 1 つの大きな供給源は、脳内で鉄の貯蔵および利用に主な役割を果たすフェリチンの第 2 鉄型である。各フェリチン分子は、異なる染色体上にコードされる異なる比率の H (重) および L (軽) 鎖サブユニットからなり、またそのフェリチン分子の機能において異なる役割を果たす。H-豊富フェリチン (H-rich ferritin) は鉄封鎖に効率的であり且つ高い鉄利用性および低い鉄貯蔵性を有する臓器において優勢であるが、一方 L-豊富フェリチン (L-rich ferritin) は鉄核形成に効率的であり且つ鉄貯蔵に関係する。脳内では、種々の細胞型が、それらの機能的役割と一致するフ

50

ェリチンアイソフォームを含む。フェリチンは、独特な磁気特性を有し、そしてMR組織緩和時間中の鉄誘導性変化の主な原因であると考えられる。フェリチンの量は脳内のトランスフェリンの量の10倍であり、各フェリチン分子は4500までの鉄原子を封鎖する能力を有する。フェリチンは、希突起膠細胞(oligodendrocyte)、星状細胞(astrocyte)、および小膠細胞(microglia)内のミエリン中に貯蔵される。マクロファージは、フェリチンをヘモシデリン( $T_2^*$ 強調MRI画像においてシグナル変化を生じる別の強力な常磁性物質)に変換する。この一般的な知識にも関わらず、フェリチンのMRI特性は十分に理解されていない。 $R_2$ の予測される場依存性は静場(static field)の二乗である。対照的に、全ての証拠は、場強度(field strength)に伴う $R_2$ における直線的变化を示す。さらに、緩和率は非常に高く、単純な常磁性によって説明できないことが一般的に見出されている。最近の文献が、 $2.19 \pm 0.05 \text{ / s / mg Fe / g}$ (他の測定と矛盾しない値)の $R_1$ についてのフェリチンの緩和度を引用する(Gossuinら、Magn Reson Med, 43(2):237-43(2000))。

10

20

30

40

50

#### 【0008】

脳鉄の2番目に大きい供給源は、遊離鉄である。捕捉鉄(trapped iron)の他の供給源も存在するが、それらの濃度は低い。相測定、 $R_2$ または $R_2'$ データおよび脳鉄の他の測定と一致して、脳幹神経節(basal ganglia)は、大脳半球および白質よりも多くの染色可能な鉄を含む。死後の脳鉄のアッセイから、鉄レベルは、高齢個体についての赤核において $2 \mu\text{g / gm}$ であるのに対して、一方淡蒼球における正常レベルは約 $0.25 \mu\text{g / gm}$ 組織であった。他の観察としては、アルツハイマー病およびパーキンソン病における海馬内の鉄貯蔵の増加、老化時の灰白質におけるフェリチンの増加、および星状細胞鉄の変化しないレベルが挙げられる。

#### 【0009】

動物(Fenziら、J Magn Reson Imaging、13(3):392-6(2001))およびヒト(Bonkovskyら、Radiology、212(1):227-34(1999);Bartzokisら、Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)、46(4):821-33(2000))に関する強磁場の成果が、脳鉄を定量することを試みてきた。その風潮は、鉄含有率が増加するにつれて $R_2$ が増加することを明瞭に実証するが、その結果の予測性は困難である。例えば、Fenziは、鉄が存在しない場合、 $40 \text{ / s}$ の $R_2$ を有するファントム(phantom)上で $R_2$ についてのスロープが $10 \sim 30 \text{ / s / (mg / gm Fe)}$ であることを示す。しかしながら、in vivoでは、 $150 \text{ / s}$ の単一 $T_2$ が $1.5 \sim 3.5 \text{ mg Fe / gm}$ 湿重量の範囲(臨床値のものとしては広すぎる)に相当し得る。同様に、Bonkovskyのデータによって、単一シグナル強度測定値が低濃度についての $2 \text{ / mg / gm}$ 乾燥肝および $1 \text{ / mg / g}$ 乾燥肝臓以上の濃度についての $5 \text{ / mg / gm}$ 乾燥肝の範囲に相当することが示される。

#### 【0010】

Ordidgeおよび彼のグループ(Mizkeilら、Magn Reson Imaging、15(10):1113-9(1997))は、鍵となる情報が $R_2$ ではなく $R_2'$ の中にあることを実証した。 $R_2$ に関する問題は、 $T_2$ を変化させ且つ局所的な鉄についての情報を混乱させ得る他の影響因子に起因して生じる。黒質における鉄の局所的増加にも関わらず、長いエコーのためのシグナルは、鉄含有率における増加を伴って増加し続ける $R_2'$ を用いて変則的に回復される。バックグラウンド場の変化(これは、シグナルの位相をずらし、さもなければ $R_2'$ に対して誤って高い値をもたらす)の存在下にも関わらず $R_2'$ を測定するために、Ordidgeらによってある方法が開発された。スライス選択方向にある局所的な場は、異なるスライス選択グラディエントを用いて、スキップを複数回繰り返すことによって補正された。

#### 【0011】

Gelmanらは、 $R_2$ および $R_2'$ 効果の両方を測定し、そして $R_2$ のスロープが切片

12.7 または約 80 ms の T2 を伴う 60 / s / mg 湿重量であり、R2' のスローブが切片 2.7 を伴う 50 / s / mg 湿量であり（ある人は、この非 - ゼロ切片がヘム鉄の寄与を現すると仮定するかも知れない）、さらに例示として、その淡蒼球の R2' が 12 / sec であることを見出した（Radiology, 213 (1): 135 - 40 (1999)）。実際に、多くの文献が、脳幹神経節および肝臓における鉄の T2 および T2\* 効果を実証した。さらに、鉄を伴うシグナル損失を記載するために、拡散メカニズムが使用された。さらに最近では、静止または緩慢分散レジーム (slow diffusion regime) および迅速分散レジーム (fast diffusion regime) におけるスピンの位相のずれに関する理論。この独特の特徴は、平行な繊維を評価する場合に（Hajnalら、J Comput Assist Tomogr., 16 (4): 506 - 13 (1992)）、そして脳内の酸素含有量を測定するために（Anand Lin, J Cereb Blood Flow Metab., 20 (8): 1225 - 36 (2000)）、考慮される。

10

20

30

40

50

#### 【0012】

T2\* 測定および R2' 定量化は、脳鉄測定に最適であると現在考えられる。Gillettら（J Neurol Sci., 168 (1): 21 - 7 (1999)）は、11.7 T の場強度にて TE = 9 ms（本発明者が最良な相コントラストイメージのために 1.5 T で使用するものとほとんど正確に等価である）を伴う 3D グラディエントエコー構造を使用する。鉄は、AD の神経病理学的徴候（老人性斑および神経原線維のもつれを含む）を有する十分に確立されたマウスモデルにおけるマイネルトの基底部のような基底前脳コリン作動性構造中で見られるが、一方高い鉄含有率が AD における淡蒼球中で観測される。

#### 【0013】

AD を最も発病しそうな忘却しやすい個体は、痴呆の発病より前に、軽度認知障害または軽度認知機能障害症候群（MCI）として知られる状態を有する。MCI は、個体の年齢および教育レベルとして異常である記憶障害によって識別される。MCI を有する全ての個体が AD を発症するわけではないが、MCI は AD の初期の始まりについての潜在的なマーカーとして役立ち得る。数人の研究者らは、MCI が初期 AD として見なされ、そして MCI で診断される個体が薬物治療からの恩恵を受けるであろうことを示唆した（Sramekら、Ann Pharmacother., 34 (10): 1179 - 88 (2000)）。このように、MCI スクリーニングは早期の AD 介入および / または AD 予防の点から有益であり得る。

#### 【0014】

##### 発明の要旨

1 つの局面において、本発明は、ヒト由来の野生型 IRP - 2 のアミノ酸残基 136 - 216 に相当するペプチドループをコードする配列を含む精製または単離された核酸を提供し、ここで前記配列は、前記ペプチドループ内に変異を含み、ここで前記変異は、前記ペプチドループ内に存在するシステイン残基の酸化を受ける能力を妨げる（interfere）。1 つの実施形態において、この核酸配列は、配列番号 3、5、7、9、11、13、および 15 の少なくとも 1 つを含み得る。好ましくは、この核酸配列は、配列番号 4、6、8、10、12、14、および 16 から成る群より選択される配列を含むペプチドをコードする。

#### 【0015】

別の好ましい実施形態において、精製または単離されたポリペプチドは、ヒト由来の野生型 IRP - 2 のアミノ酸残基 136 - 216 に相当するペプチドループを含み、ここで前記配列は、前記ペプチドループ内に変異を含み、ここで前記変異は、前記ペプチドループ内に存在するシステイン残基の酸化を受ける能力を妨げる。IRP - 2 タンパク質は、配列番号 4、6、8、10、12、14、および 16 から成る群より選択される配列を含み得る。好ましくは、IRP - 2 タンパク質は、配列番号 4、6、8、10、12、14、および 16 から成る群より選択される。さらに好ましくは、本発明は、神経変性疾患の診

断のためのプローブを作製する方法におけるこのような変異ポリペプチドの使用に関し、そして前記変異ポリペプチド上に存在するエピトープに結合する抗体を生成することに関し、ここで前記抗体は野生型 I R P - 2 タンパク質またはそのフラグメントと交差反応しない。その変異体は、システイン残基の置換または欠失を含み得る。さらに、この生成工程は、前記抗体を産生する細胞を培養することを包含し得る。

#### 【0016】

別の実施形態において、本発明は、神経変性疾患の処置または予防を必要とする被験体を同定する方法に関し、以下：ポリヌクレオチドまたはタンパク質を有する前記被験体由来する生物学的サンプルを得ること；プローブを提供すること（前記プローブは、野生型または変異 I R P - 2 タンパク質と相互作用するプローブおよび野生型または変異 I R P - 2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドと相互作用するプローブからなる群より選択される）；プローブがこの生物学的サンプル中のポリヌクレオチドまたはタンパク質と相互作用する条件下において、前記サンプルを前記プローブと接触させること；この生物学的サンプル中のポリヌクレオチドまたはタンパク質と相互作用するプローブの量を検出すること；およびこの生物学的サンプル中のポリヌクレオチドまたはタンパク質と関係するプローブの存在または非存在を決定することによって、前記被験体を神経変性疾患の処置または予防を必要とする被験体として同定すること、を包含する。好ましくは、この方法は、このプローブがこの生物学的サンプル中のポリヌクレオチドまたはタンパク質と相互作用するか否かを決定することを包含する。さらに好ましくは、このプローブは、核酸、タンパク質、および擬ペプチドから成る群より選択される。さらに、ポリヌクレオチドまたはタンパク質と相互作用するプローブの量の検出は、蛍光活性化セルソーティング（*fluorescence-activated cell sorting*）（FACS）、免疫沈降、ウェスタンブロット、イムノクロマトグラフィー、抗体染色、およびハイブリダイゼーションアッセイから成る群より選択される技術の使用を含む。さらに、神経変性疾患はアルツハイマー病である。

10

20

#### 【0017】

別の好ましい実施形態において、本発明は、配列番号 4、6、8、10、12、14、および 16 から成る群より選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的に結合し得る抗体に関する。好ましくは、この抗体が前記タンパク質の少なくとも 10 個の連続するアミノ酸を含むポリペプチドに特異的に結合し、そして前記タンパク質がシステイン残基の変異を有する。さらに好ましくは、この抗体はモノクローナル抗体である。

30

#### 【0018】

別の好ましい実施形態において、本発明は、変異 I R P - 2 タンパク質を特異的に結合し得るが野生型 I R P - 2 タンパク質を特異的に結合しない精製または単離された抗体に関し、ここで、前記変異 I R P - 2 タンパク質は配列番号 2 のアミノ酸配列に相当するペプチドループ内に変異を有する。

#### 【0019】

別の局面において、本発明は、ヒト患者において軽度認知機能障害（MCI）を他の形態の痴呆と区別する方法に関し、脳鉄を定量および/またはモニターするために、その患者に対して磁気共鳴画像法（MRI）を行うことを包含し、ここで脳鉄の異常なレベルまたは分布が MCI の存在を示す。

40

#### 【0020】

##### 発明の詳細な説明

本発明の 1 つの局面は、I R P - 2 遺伝子内における変異が、体内における分解を阻害し且つそれによって鉄のホメオスタシスを混乱させる I R P - 2 タンパク質の型をもたらすという発見に関する。I R P - 2 のペプチドループ内にいくつかの変異が起こり、ここで重要なシステイン残基は、分解プロセスを開始する鉄-依存的な酸化事象を受ける。

#### 【0021】

実施形態としては、変異 I R P - 2 タンパク質をコードする核酸、変異 I R P - 2 タンパク質、およびこれらの分子のフラグメントが挙げられる。さらに、実施形態としては、変

50

異 I R P - 2 タンパク質またはそのフラグメントをコードする核酸に相補的である核酸および変異 I R P タンパク質またはそのフラグメントを結合する抗体が挙げられる。好ましくは、本明細書中に記載される相補性核酸は、変異 I R P - 2 タンパク質をコードする核酸を特異的に検出し、そして変異 I R P - 2 タンパク質をコードする核酸を野生型 I R P - 2 タンパク質をコードする核酸と区別する。同様に、本明細書中に記載される好ましい抗体は、変異 I R P - 2 タンパク質を特異的に検出し、そして変異 I R P - 2 タンパク質を野生型 I R P - 2 タンパク質と区別する。

#### 【0022】

本明細書中に記載されるいくつかのアッセイは、I R P - 2 タンパク質をコードする核酸または I R P - 2 タンパク質自体またはこれらの分子のフラグメントにおける変異の存在を検出するように設計される。従って、野生型および/もしくは変異 I R P - 2 タンパク質またはそのフラグメントをコードする核酸に相補的な核酸配列、ならびに野生型および/または変異 I R P - 2 タンパク質上のエピトープを結合する抗体が、神経変性疾患（アルツハイマー病を含むが、これに限定されない）のための *ex vivo* マーカーとして使用される。したがって、本明細書中に記載される診断的实施形態は、核酸 - ベースおよびタンパク質 - ベースのアッセイの両方ならびにこれらのアッセイを統合するキットに関し、これは、生物学的サンプル（例えば、末梢血細胞を有するサンプル）中の野生型および/または変異 I R P - 2 タンパク質をコードする核酸または I R P - 2 タンパク質を検出する。診断的決定のための自動技術（標準的なフローサイトメトリー技術およびアレイ工学のような）が、本明細書中に記載される実施形態のいくつかと共に使用され得る。野生型または変異型 I R P - 2 タンパク質を検出するモノクローナルおよびポリクローナル抗体は、例えば患者が神経変性疾患（アルツハイマー病のような）にかかる傾向を有するかどうかを迅速に決定するために、フローサイトメトリーと共に使用され得る。

#### 【0023】

支持体 - ベースのアッセイ（E L I S A、イムノクロマトグラフィー、およびイムノストリップアッセイのような）は、また、野生型および/または変異 I R P - 2 タンパク質の存在または非存在を検出するように適用され得る。1つの実施形態において、例えば、野生型または変異型 I R P - 2 タンパク質をコードする核酸に結合するプローブあるいは変異型または野生型 I R P - 2 タンパク質に結合する抗体は、支持体に結合され、そして生物学的サンプルをスクリーニングするために使用され、さらにそれによって神経変性疾患の診断を提供する。

#### 【0024】

さらに、神経変性疾患（アルツハイマー病のような）の診断は、支持体に結合された野生型または変異型 I R P - 2 タンパク質あるいはそのフラグメントを使用することによって達成され得る。従って、固定化 I R P - 2 タンパク質またはそのフラグメントは、循環する抗体（*circulating antibodies*）を有する生物学的サンプルと接触され、そして変異型または野生型 I R P - 2 タンパク質に対する抗体の存在または非存在が2次検出分子（例えば、標識抗 - I g G 抗体）を使用することによって測定され得る。I R P - 2 の変異型に対する抗体の存在は、神経変性疾患にかかる傾向を示唆する。

#### 【0025】

I R P - 2 のアミノ酸残基 136 - 216 によって形成されるペプチドループで起こる鉄 - 依存型酸化的修飾によって、I R P - 2 分解（およびそれによる鉄ホメオスタシスの調節）が健康な個体において開始されることが考えられる。この鉄 - 依存型酸化は、ペプチドループ内の3つの重要なシステイン残基を修飾し、結果的にアミノマロン酸産生をもたらす。アミノマロン酸への変換は、ユビキチン化のための段階を準備し、これは、I R P - 2 のプロテオソーム分解を合図する。対照的に、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病）を患う個体が I R P - 2 遺伝子（酸化的修飾を受け得ないか、あるいは酸化的修飾のレベルの減少を示す I R P - 2 タンパク質をもたらす）中に変異を有することが考慮される。いくつかの個体は、また、I R P - 2 タンパク質の多面的勾配（*multifaceted gradient*）を有し、ここで、ある I R P - 2 タンパク質は鉄 - 依存

10

20

30

40

50



的酸化を受け得ず、あるIRP-2タンパク質は適度な量の鉄-依存的酸化を受け、また他のIRP-2タンパク質は正常レベルの鉄-依存的酸化を受ける。変異および野生型IRP-2タンパク質ならびに/またはこれらの分子をコードする核酸のレベルをモニターすることによって、神経変性疾患の予後診断が行われ得る。

#### 【0026】

実施形態としては、体内での分解に対して耐性のある変異IRP-2タンパク質をコードする核酸、それらに対する相補物 (complements)、および少なくとも1つの変異を有するこれらのタンパク質のフラグメントが挙げられる。望ましくは、これらの核酸は、ヒト野生型IRP-2の配列のアミノ酸残基136-216に相当するペプチドループ内に変異を有するタンパク質をコードする。野生型IRP-2ペプチドループの領域をコードする189ヌクレオチド長のフラグメントは、配列表中に提供される (配列番号1)。ヒト野生型IRP-2をコードする全長cDNA配列は、配列番号17中に提供され、そして本明細書中で明白にその全体が参考として援用されるGuoら、J. Biol. Chem. 270 16529 (1995) において見出され得る。さらに、ラット野生型IRP-2をコードする全長cDNA配列は、配列番号19中に提供され、そして本明細書中で明白にその全体が参考として援用されるGuoら、J. Biol. Chem. 270 16529 (1995) において見出され得る。野生型IRP-2核酸についての参照がなされる場合、その内容によって、配列番号17および/または18において提供されるもの、あるいは本明細書中で明白にその全体が参考として援用されるGuoら、J. Biol. Chem. 270 16529 (1995) において見出され得るものを  
含む野生型IRP-2分子に言及することが意味される。

10

20

#### 【0027】

好ましくは、核酸の実施形態は、野生型ヒトIRP-2のアミノ酸残基136-216に相当するペプチドループ内のシステイン残基の鉄-依存的酸化を受ける能力の喪失 (inability) もたらす少なくとも1つの突然変異を有する。この突然変異は、このペプチドループ内のシステイン残基の置換または欠失、あるいは鉄-依存的酸化を防止するようにペプチドループの3次元構造を摂動させる (perturbs) 突然変異を含み得る。変異IRP-2タンパク質のペプチドループの領域をコードするいくつかの核酸の配列は、配列番号3、5、7、9、11、13および15に開示される。

#### 【0028】

いくつかの核酸実施形態は、変異IRP-2をコードするゲノムDNA、RNA、およびcDNA、それらに対する相補物または少なくとも1つの突然変異を含むこれらの分子のフラグメントである。いくつかの実施形態は、このペプチドループ内に複数の置換および/または欠失をもたらす複数の変異 (例えば、1を超えるシステインの置換および/または欠失をもたらす変異) を含む。好ましくは、核酸実施形態としては、配列表 (配列番号3、5、7、9、11、13および15中に示されるヌクレオチド配列ならびにそれらに対する相補物ならびにそのフラグメントが挙げられる。ヒト、哺乳動物、および他の生物に由来する変異IRP-2をコードする核酸配列もまた、このような配列を得るための方法と同様に、実施形態である。この核酸実施形態は、改変、変異または変化され得、その結果改変、変異または変化は保存的アミノ酸置換をもたらす。

30

40

#### 【0029】

本明細書中に記載されるポリペプチド実施形態は、体内での分解に耐性を有するIRP-2の変異型および少なくとも1つの突然変異を有するこれらの蛋白質のフラグメントに関する。望ましくは、このようなポリペプチドは、ヒト野生型IRP-2のアミノ酸残基136-216に相当するペプチドループ内に突然変異を有し、これは体内における分解に関わる分子の安定性 (例えば、プロテオソーム分解に対する安定性) に寄与する。野生型IRP-2ペプチドループの領域に相当する63アミノ酸長のペプチドは、配列表中に提供される。 (配列番号2)。ヒト野生型IRP-2の全長アミノ酸配列は、配列番号18中に提供され、そして本明細書中で明白にその全体が参考として援用されるGuoら、J. Biol. Chem. 270 16529 (1995) において見出され得る。さらに

50

、ラット野生型 I R P - 2 の全長アミノ酸配列は、配列番号 20 中に提供され、そして本明細書中で明白にその全体が参考として援用される G u o ら、J . B i o l . C h e m . 270 16529 ( 1995 ) において見出され得る。野生型 I R P - 2 タンパク質についての参照がなされる場合、その内容によって、配列番号 17 および / または 18 において提供されるもの、あるいは本明細書中で明白にその全体が参考として援用される G u o ら、J . B i o l . C h e m . 270 16529 ( 1995 ) において見出され得るものを含む野生型 I R P - 2 分子に言及することが意味される。

#### 【 0 0 3 0 】

好ましくは、ペプチド実施形態は、ヒト野生型 I R P - 2 のアミノ酸残基 136 - 216 に相当するペプチドループ内のシステイン残基の鉄 - 依存的酸化を混乱させる少なくとも 1 つの変異を有する。この変異は、この領域内のシステイン残基の置換または欠失、あるいは I R P - 2 の鉄 - 依存的酸化に影響するようにペプチドループの 3 次元構造を摂動させる突然変異を含み得る。いくつかの実施形態は、このペプチドループ内の複数の変異を含む ( 例えば、1 を超えるシステインが突然変異される )。いくつかの変異 I R P - 2 ペプチドは、配列番号 4、6、8、10、12、14 および 16 中に提供される。

10

#### 【 0 0 3 1 】

ポリペプチド実施形態としては、また、配列表に示される部分的または完全なアミノ酸配列 ( 配列番号 4、6、8、10、12、14 および 16 )、および非 - 保存的アミノ酸置換を有する配列番号 4、6、8、10、12、14 および 16 のポリペプチド及びこれら分子に類似する擬ペプチド ( p e p t i d o m i m e t i c s ) を含む ( これに限定されない ) このような分子についての機能的等価物が挙げられる。

20

#### 【 0 0 3 2 】

さらなる実施形態としては、本明細書中に記載されるポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに結合する分子を調製する方法が挙げられる。実施形態としては、また、例えば野生型および / または変異 I R P - 2 を認識するポリクローナルおよびモノクローナル抗体が挙げられる。好ましい抗体は、これらの分子間を区別するために、野生型 I R P - 2 ではなく変異 I R P - 2 上のエピトープに結合するか、またはその反対である。本明細書中に記載されるポリクローナルおよびモノクローナル抗体を製造するための新規の方法が提供される。

#### 【 0 0 3 3 】

診断的实施形態 ( 診断キットを含む ) が設計され、生物 ( 例えば、昆虫、動物、哺乳動物、およびヒト ) における神経変性疾患への傾向が同定される。好ましくは、診断的实施形態は、アルツハイマー病への危険性を有する被験体を同定するために使用される。核酸およびタンパク質 - ベースの診断剤の両方が、本発明の局面によって包含される。すなわち、いくつかの診断的实施形態は、前記診断に用いる核酸またはタンパク質と相互作用するプローブを使用することにより診断に用いる核酸またはタンパク質の存在または非存在を検出することによって、神経変性疾患への傾向を決定する。この診断に用いる核酸は、例えば、野生型または変異 I R P - 2 タンパク質あるいはそのフラグメントをコードする核酸であり得る。診断に用いるタンパク質は、例えば、野生型または変異 I R P - 2 タンパク質あるいはそのフラグメントであり得る。用語「プローブ」は、その内容に依存して、診断的核酸または診断的タンパク質またはそのフラグメントと相互作用する分子に言及され得る。「プローブ」の例としては、野生型または変異 I R P - 2 核酸配列 ( 例えば、ヒトまたはラット I R P - 2 ) の少なくともフラグメントに相補的な核酸、および野生型または変異 I R P - 2 タンパク質配列 ( 例えば、ヒトまたはラット I R P - 2 ) 上に存在するエピトープと相互作用する抗体が挙げられる。好ましいプローブは、前記変異診断用核酸または診断用タンパク質ではなく前記野生型診断用核酸または診断用タンパク質と特異的に相互作用するか、またはその反対である。

30

40

#### 【 0 0 3 4 】

いくつかの診断的实施形態としては、例えば、野生型または変異 I R P - 2 あるいはそのフラグメントの生物学的サンプル中に存在する抗体と相互作用する能力を決定する支持体

50

- 結合アッセイに関する。望ましくは、この野生型または変異 I R P - 2 あるいはそのフラグメントは、多重測定様式で支持体上に配置される。好ましい実施形態としては、野生型ヒト I R P - 2 のアミノ酸残基 136 - 216 に相当するペプチドループ（これは I R P - 2 の安定性に寄与する）中に突然変異を有する I R P - 2 またはそのフラグメントが挙げられる。さらに好ましくは、多重測定剤を作製するよう支持体に結合される I R P - 2 またはそのフラグメントが、ペプチドループ内のシステイン残基の鉄 - 依存的酸化を受ける能力を混乱させる少なくとも 1 つの突然変異を有する。

#### 【0035】

実施形態としては、また、神経変性疾患を患っている被験者または神経変性疾患にかかる危険性がある被験体を同定するために使用され得る診断的キットが挙げられる。これらの診断的キットは、野生型または変異 I R P - 2 タンパク質をコードする核酸と相補的な核酸、または野生型もしくは変異 I R P - 2 タンパク質を結合する抗体（まとめて「プローブ」と呼ばれる）を含み得る。さらに、この診断的キットは、サンプルを固定化するための種々の支持体、試薬、酵素、検出試薬、および指示書を含み得る。

10

#### 【0036】

本明細書中に記載される診断方法のいくつかは、鉄代謝における欠損（これは、神経変性表現型（例えば、AD）の一因となる）を同定する。I R P - 2 タンパク質をコードする核酸または I R P - 2 タンパク質自体における多型性を検出することによって、例えば、神経変性疾患にかかる危険性がある被験体が同定され得る。他の診断方法としては、変異 I R P - 2 タンパク質をコードする核酸または変異 I R P - 2 タンパク質の異常な量またはレベルの検出が挙げられる。様々な多型の I R P - 2 タンパク質のレベルをモニターすることによって、神経変性疾患に関する予後診断が行われ得る。1 つの方法によって、I R P - 2 の各変異型に対する野生型 I R P - 2（または、これらの分子をコードする核酸）の比率が作成され、そして健康または疾患個体より生じるこの比率についての比較分析に基づいて、神経変性疾患についての予後診断が行われる。さらに、I R P - 2 の全変異型に対する野生型の比率が生成され、また被験体が神経変性疾患にかかる危険性を有するか否かを決定するために使用され得る。以下の章では、核酸実施形態のいくつかをより詳細に記載する。

20

#### 【0037】

変異 I R P - 2 ポリペプチドをコードする核酸

30

変異 I R P - 2 タンパク質のファミリーは、その分子の酸化および付随的な分解を不安にさせる少なくとも 1 つの突然変異の存在によって同定され得ると発見された。本発明の核酸実施形態としては、変異 I R P - 2 タンパク質およびそのフラグメントをコードする核酸が挙げられる。いくつかの実施形態としては、例えば、ゲノム DNA、RNA、およびこれらの分子をコードする cDNA が挙げられる。変異 I R P - 2 タンパク質をコードする核酸は、多くの異なる生物（昆虫、動物、および哺乳動物を含むがこれらに限定されない）中に存在し得る。

#### 【0038】

本発明のヌクレオチド配列としては、例えば、以下が挙げられる：（a）配列表（配列番号 3、5、7、9、11、13 および 15）に示される DNA 配列；（b）配列表（配列番号 4、6、8、10、12、14 および 16）に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列；（c）配列表（配列番号 3、5、7、9、11、13 および 15）に示される DNA 配列の相補物にストリンジェントな条件下（例えば、0.5 M NaHPO<sub>4</sub>、7.0% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、1 mM EDTA 中でのフィルター - 結合 DNA に対するハイブリダイゼーション（50 にて）および 0.2 × SSC / 0.2% SDS 中での洗浄（50 にて））でハイブリダイズする任意のヌクレオチド配列；および（d）配列表（配列番号 4、6、8、10、12、14 および 16）に提供されるアミノ酸配列をコードする DNA 配列の相補物に低ストリンジェントな条件下（例えば、0.5 M NaHPO<sub>4</sub>、7.0% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、1 mM EDTA 中でのハイブリダイゼーション（37 にて）および 0.2 × SSC / 0.2%

40

50

S D S 中での洗浄（ 3 7 にて ） でハイブリダイズする任意のヌクレオチド配列。

#### 【 0 0 3 9 】

本発明の実施形態としては、また、天然に存在するか、または操作される（ e n g i n e e r e d ）他の生物（例えば、植物、菌類、酵母、昆虫、動物、および哺乳動物）から単離される変異 I R P - 2 核酸が挙げられる。他の種において変異 I R P - 2 核酸を単離するための方法が下記に提供される。実施形態としては、また、上記に記載される配列のフラグメント、修飾体（ m o d i f i c a t i o n s ）、誘導体、および改変体が挙げられる。所望される実施形態としては、例えば、変異 I R P - 2 核酸に特有な少なくとも 9 つの連続的塩基を有する核酸またはそれに相補的な配列が挙げられ、そして本発明の好ましいフラグメントとしては、変異 I R P - 2 核酸に特有な少なくとも 9 個の連続的塩基またはそれに相補的な配列が挙げられる。これを考慮すると、核酸実施形態は、 9 ~ 約 1 0 0 個の連続的ヌクレオチドを有し得る。本発明のいくつかの D N A フラグメントとしては、例えば、変異 I R P - 2 核酸に特有な 9 , 1 0 , 1 1 , 1 2 , 1 3 , 1 4 , 1 5 , 1 6 , 1 7 , 1 8 , 1 9 , 2 0 , 2 1 , 2 2 , 2 3 , 2 4 , 2 5 , 2 6 , 2 7 , 2 8 , 2 9 , 3 0 , 3 1 , 3 2 , 3 3 , 3 4 , 3 5 , 3 6 , 3 7 , 3 8 , 4 0 , 4 1 , 4 2 , 4 3 , 4 4 , 4 5 , 4 6 , 4 7 , 4 8 , 4 9 , 5 0 , 5 1 , 5 2 , 5 3 , 5 4 , 5 5 , 5 6 , 5 7 , 5 8 , 5 9 , 6 0 , 6 1 , 6 2 , 6 3 , 6 4 , 6 5 , 6 6 , 6 7 , 6 8 , 6 9 , 7 0 , 7 1 , 7 2 , 7 3 , 7 4 , 7 5 , 7 6 , 7 7 , 7 8 , 7 9 , 8 0 , 8 1 , 8 2 , 8 3 , 8 4 , 8 5 , 8 6 , 8 7 , 8 8 , 8 9 , 9 0 , 9 1 , 9 2 , 9 3 , 9 4 , 9 5 , 9 6 , 9 7 , 9 8 , 9 9 , 1 0 0 , 1 2 5 , 1 5 0 , 1 7 5 , 2 0 0 , 2 2 5 , および 2 4 0 個より少ないか、もしくはこれに等しい連続的ヌクレオチドを有する核酸が挙げられ、そして好ましくは配列番号 3、5、7、9、11、13 および 15 の配列またはその相補物によって提供される領域を包含する。好ましくは、核酸実施形態としては、しかしながら、配列番号 3、5、7、9、11、13 および 15 の配列に特有な配列またはその相補物の少なくとも 12、13、14、15、16、17、18 または 19 連続的なヌクレオチドが挙げられる。さらに好ましくは、核酸実施形態としては、配列番号 3、5、7、9、11、13 および 15 に特有な配列またはその相補物の少なくとも 20 ~ 30 個の連続的ヌクレオチドが挙げられる。

10

20

30

#### 【 0 0 4 0 】

核酸実施形態は、また、機能的に等価な分子をコードする配列を提供する置換、付加、または欠失のような突然変異によって改変され得る。配列をコードするヌクレオチドの縮重のため、配列番号 4、6、8、10、12、14 および 16 に示されるのと実質的に同じ変異 I R P - 2 アミノ酸をコードする他の D N A 配列がいくつかの実施形態において使用され得る。これらとしては、変異 I R P - 2 核酸の全部または特有な部分を含む核酸配列、あるいは配列内の機能的に等価なアミノ酸残基（従って、サイレント変化（ s i l e n t c h a n g e ）を生み出す）、または配列内の機能的に非 - 等価なアミノ酸残基（従って、検出可能な変化を生み出す）をコードする異なるコドンの置換によって改変された変異 I R P - 2 核酸の全部または特有な部分に相補的な核酸が挙げられる。

40

#### 【 0 0 4 1 】

上記の核酸配列は、生物工学的および診断的用途（例えば、核酸ハイブリダイゼーションアッセイ、サザンおよびノーザンブロット分析など、および神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病）の予後診断）を有する。配列表配列番号 1、3、5、7、9、11、13 および 15 に開示される核酸配列を使用することによって、野生型および / または変異 I R P - 2 核酸に相補的なプローブが設計され、さらにオリゴヌクレオチド合成によって製造され得る。所望されるプローブは、配列番号 1 と比較してこれらの分子に特有である配列番号 3、5、7、9、11、13 および 15 の核酸配列に相補的な核酸配列を含む。これらのプローブが使用され、この核酸実施形態の天然供給源を単離するために種々の生物（例えば、植物、菌類、真菌類、酵母、昆虫、動物、および哺乳動物）に由来する c D N

50

Aまたはゲノムライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。スクリーニングは、フィルターハイブリダイゼーション（例えば、デュプリケートフィルターを使用する）によって行われ得る。標識プローブは、好ましくは、配列番号1と比較してこれらの分子に特有であるもの（配列番号3、5、7、9、11、13および15）の核酸配列に相補的な核酸配列の少なくとも15～30塩基対を含む。使用されるハイブリダイゼーション洗浄条件は、好ましくは、そのcDNAライブラリーが標識配列の起源となる生物の型と異なる生物に由来する場合、より低いストリンジェンシーのものである。

#### 【0042】

変異IRP-2核酸のクローニングに関しては、例えば、ハイブリダイゼーションは0.5M NaHPO<sub>4</sub>、7.0% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、1mM EDTA中で37℃にて一晩中行われ得、そして洗浄は0.2×SSC/0.2% SDS中で37℃にて行われ得る。低ストリンジェンシーな条件は当業者に周知であり、そしてライブラリーおよび標識配列が由来する特定の生物に依存して予測可能に変更し得る。この条件に関する指示は、例えば、Sambrookら、1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press, N.Y.; and Ausubelら、1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.を参照のこと。

10

#### 【0043】

さらに、変異または野生型IRP-2核酸またはその部分に相補的な核酸からの配列は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）あるいは他の酵素-媒介型核酸増幅技術を使用する単離および診断手順における使用のために、慣用のオリゴヌクレオチド合成法によってオリゴヌクレオチドプライマーを作製するために使用され得る。変異IRP-2核酸は、本明細書中で開示される変異IRP-2遺伝子産物内のアミノ酸配列に基づいて設計される2つの縮重オリゴヌクレオチドプライマープールを用いるPCRを行うことによって、目的の生物から単離され得る。反応のためのテンプレートは、例えば、変異IRP-2RNAを発現すると分かっているまたは考えられる生物の細胞または組織から調製されるmRNAの逆転写によって得られるcDNAであり得る。種々のPCR技術が当業者によく知られている。PCR技術の総説に関しては、Molecular Cloning to Genetic Engineering White, B.A. 編（Methods in Molecular Biology 67において）：Humana Press, Totowa（1997）（その全体が本明細書中で参考として援用される開示）、および「PCR Methods and Applications」（1991, Cold Spring Harbor Laboratory Press）と題される刊行物（その全体が本明細書中で参考として援用される開示）を参照のこと。

20

30

#### 【0044】

mRNAの増幅に関しては、mRNAをcDNAへ逆転写し、次いでPCR（RT-PCR）すること；または米国特許第5,322,770（その開示は全体が本明細書中で参考として援用される）に記載されるような両工程のために単一酵素を使用することは、本発明の範囲内である。別の技術としては、Marshall R.L.ら、（PCR Methods and Applications 4:80-84, 1994）（その開示は全体が本明細書中で参考として援用される）によって記載されるように、逆転写酵素非対称Gapリガーゼ連鎖反応（Reverse Transcriptase Asymmetric Gap Ligase Chain Reaction）（RT-AGLCR）の使用が挙げられる。簡単には、RNAが、標準的方法に従って、適切な細胞または組織源より単離される。逆転写反応は、増幅フラグメントの最も5'末端に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを第1ストランド合成のプライマーとして用いて、RNA上で行われる。生じるRNA/DNAハイブリッドは、次いで、標準的なターミナルトランスフェラーゼ反応を用いて、グアニンで「テイル付与（tailed）」される。

40

50

次いで、このハイブリッドはRNAse Hで消化され、そして第2ストランド合成がポリ-Cプライマーでプライムされる。このように、増幅フラグメントのcDNA配列上流が容易に単離される。使用され得るクローニング方法の総説については、Sambrookら、1989(前出)を参照のこと。

#### 【0045】

これらの増幅産物の各々において、増幅されるべき配列の各側におけるプライマーが、dNTPsおよび熱安定性ポリメラーゼ(Taqポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼ、またはVentポリメラーゼのような)と共に、適切に調製される核酸サンプルへ添加される。このサンプル中の核酸は変性され、そしてプライマーはサンプル中の相補的核酸配列に特異的にハイブリダイズされる。次いで、このハイブリダイズされたプライマーは伸長される。その後、変性、ハイブリダイゼーション、および伸長の次のサイクルが開始される。このサイクルが複数回繰り返され、プライマー部位の間の核酸配列を含む増幅フラグメントが生成される。PCRは、さらに米国特許第4,683,195号、4,683,202号および4,965,188号(その開示は全体が本明細書中で参考として援用される)を含むいくつかの特許に記載されている。

10

#### 【0046】

プライマーは、変異IRP-2核酸に特有な(配列番号3、5、7、9、11、13および15)の核酸配列の部分に対して実質的に相補的であるように選択され、これによって、プライマー間の配列が増幅され得る。好ましくは、プライマーは、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29および30ヌクレオチド長である。安定なハイブリッドの形成は、DNAの溶解温度( $T_m$ )に依存する。 $T_m$ はプライマーの長さ、溶液のイオン強度およびG+C含有率に依存する。G:C対は3つのH結合によって保持されるが、A:T対は2つしか有さないのので、プライマーのG+C含有率が高い程、溶解温度が高くなる。本発明の増幅プライマーのG+C含有率は、好ましくは、10~75%の範囲であり、さらに好ましくは35%~60%であり、そして最も好ましくは40~55%である。アッセイ条件の特定の設定下でのプライマーについての適切な長さは、当業者によって経験的に決定され得る。

20

#### 【0047】

プライマーの間隔は、増幅されるべきセグメントの長さに関係する。本発明の内容においては、変異IRP-2核酸のフラグメントをコードする核酸配列を有する増幅セグメントは、少なくとも約25bp~35kbのサイズの範囲をとり得る。25~100bpの増幅フラグメントが代表的であり、50~200bpのフラグメントが好ましく、200~300bpのフラグメントが非常に好ましい。変異IRP-2核酸の領域の特異的増幅を可能にする任意の配列を有し且つ、例えば、クローニングを容易にする制限部位のような改変を含み得る増幅プライマーが、認識されるであろう。

30

#### 【0048】

PCR産物は、サブクローニングされ、そして増幅配列が変異IRP-2遺伝子の配列を表すことを確かめるために配列決定され得る。次いで、PCRフラグメントが使用され、種々の方法によって全長cDNAクローンが単離され得る。例えば、増幅フラグメントが標識され、さらにcDNAライブラリー(バクテリオファージcDNAライブラリーののような)をスクリーニングするために使用され得る。あるいは、ゲノムライブラリーのスクリーニングを介してゲノムクローンを単離するために、標識フラグメントが使用され得る。多くの異なる生物(特にヒト)に由来するゲノムクローンの同定および特徴付けは、診断試験ならびに神経変性疾患を処置および予防するための臨床プロトコールを考案するのに有益である。

40

#### 【0049】

あるいは、ゲノムライブラリーは、変異IRP-2対立遺伝子を保有するの疑いがあるか、または知られている生物より得られるDNAを使用して構築され得、あるいはcDNAライブラリーは、変異IRP-2対立遺伝子を発現することが知られるか、または疑われる組織に由来するRNAを使用して構築され得る。次いで、正常なIRP-2遺伝子また

50

は任意の適切なそのフラグメントが標識され、そしてこのようなライブラリー中の対応する変異IRP-2対立遺伝子を同定するためにプローブとして使用され得る。しかしながら、好ましくは、このプローブは、これらの変異分子に特有である配列番号3、5、7、9、11、13および15の配列と相補的である。次いで、変異IRP-2遺伝子配列を含むクローンが精製され、そして当業者に周知の方法に従って配列解析にかけられる。

#### 【0050】

さらに、発現ライブラリーは、例えばこのような変異対立遺伝子を保有する疑いがあるまたは知られている生物において変異IRP-2対立遺伝子を発現することが知られているかまたは疑われる組織から単離されるRNAより合成されるcDNAを利用して、構築され得る。この方法において、推定上変異細胞によって作製される遺伝子産物が、発現され、さらに野生型または変異IRP-2遺伝子産物に対して惹起される抗体との結合における標準的抗体スクリーニング技術を用いて、スクリーニングされ得る（スクリーニング技術については、例えば、Harlow, E. and Lane, eds., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harborを参照のこと。）。慣用の抗体スクリーニング技術を使用することによって、種々の生物の発現ライブラリーより野生型および/または変異型IRP-2タンパク質が単離され得る。IRP-2変異が機能変化（例えば、システインの酸化の減少）を伴う発現遺伝子産物を生じる場合、変異IRP-2タンパク質に対する抗体のポリクローナルセットは、高効率で変異遺伝子産物と反応し得る。このような標識抗体との反応を介して検出されるライブラリークローンは、精製され、さらに当業者に周知の方法に従って配列解析にかけられる。

10

20

#### 【0051】

実施形態は、また、以下を包含する：（a）配列および/またはその相補物（例えば、アンチセンス）をコードする前述の変異IRP-2のいずれかを含むDNAベクター；（b）コーディング配列の発現に向けた調節エレメントと作動可能に結合する前述の変異IRP-2コーディング配列のいずれかを含むDNA発現ベクター；および（c）宿主細胞におけるコーディング配列の発現に向けた調節エレメントと作動可能に結合する前述の変異IRP-2コーディング配列のいずれかを含む遺伝子的に操作された宿主細胞。これらの組換え構築物は、宿主細胞において自発的に複製され得る。あるいは、この組換え構築物は、宿主細胞の染色体DNAへ組み込まれるようになり得る。このような組換えポリヌクレオチドは、代表的に、ヒトの取り扱いのための半合成または合成起源の変異IRP-2ゲノムまたはcDNAポリヌクレオチドを含む。それゆえ、天然に存在しない変異IRP-2配列およびその相補物を含む組換え核酸が本明細書中で提供される。

30

#### 【0052】

変異IRP-2タンパク質をコードする核酸または天然に見られるような変異IRP-2遺伝子に相補的な配列を有する核酸が使用され得るけれども、それらはしばしば例えば、欠失、置換または挿入によって改変され得、そしてヒトにおいて存在しない配列を伴い得る。本明細書中で使用される場合、調節エレメントとしては、誘導型および非-誘導型プロモーター、エンハンサー、オペレーターおよび発現を駆り立て且つ調節することで当業者に知られる他のエレメントを含むがこれらに限定されない。このような調節エレメントとしては、サイトメガロウイルスhCMV前初期遺伝子、SV40アデノウイルスの初期または後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系、TRC系、ファージAの主要なオペレーターおよびプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセレートキナーゼのためのプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター、および酵母-接合因子（yeast-mating factors）のプロモーターが挙げられる。

40

#### 【0053】

さらに、組換え変異IRP-2核酸配列およびそれらの相補配列は、タンパク質のプロセッシングまたは発現を修飾するために、操作され得る。例えば（限定のためではなく）、

50

タンパク質の分泌を可能にし、さらにそれによって収集またはバイオアベイラビリティを促進させるために、変異IRP-2遺伝子がプロモーター配列および/またはリボソーム結合部位と結合されるか、またはシグナル配列がコーディング配列の上流に挿入され得る。さらに、翻訳、開始、および/または終結配列を生成および/または破壊するためか、またはコーディング領域における多様性を生成するおよび/または新しい制限部位を形成するまたは既に存在するものを破壊するためか、あるいは*in vitro*におけるさらなる修飾を促進するために、所定の核酸が*in vivo*または*in vitro*で変異され得る。当該分野において公知の突然変異誘発のためのあらゆる技術(*in vitro*部位特異的突然変異誘発を含むがこれに限定されない)が使用され得る(Hutchinsonら、J. Biol. Chem.、253:6551 (1978)、本明細書中で参考として援用される)。

10

#### 【0054】

さらに、融合タンパク質を生成するために、他のタンパク質または他のタンパク質のドメインをコードする核酸が、変異IRP-2核酸をコードする核酸に結合され得る。

#### 【0055】

融合タンパク質実施形態をコードするヌクレオチドは、例えば、無関係なタンパク質もしくはペプチド(例えば、グルタチオン; IgFcドメイン(これは、生じる融合タンパク質の安定性および半減期を増大する); マーカーとして使用され得る酵素、蛍光タンパク質、発光タンパク質(例えば、緑色蛍光タンパク質(「GFP」))に融合される全長変異IRP-2タンパク質、切端変異IRP-2タンパク質または変異IRP-2タンパク質のペプチドフラグメントをコードし得る。この融合タンパク質は、また、下記で議論されるようにバイオテクノロジーの道具としても有用である。以下の章は、ポリペプチド実施形態およびそれらの分子を作製する方法のいくつかを記載する。

20

#### 【0056】

変異IRP-2ポリペプチド

変異IRP-2ポリペプチド、これらの分子のフラグメント、およびこれらの分子に似た化学物質(擬ペプチド、改変IRP-2タンパク質、およびそれらの改変体及びバリエーションを含むが、これに限定されない)もまた、実施形態である。変異IRP-2ポリペプチドは、天然に、または遺伝子操作を介して、多くの生物(例えば、植物、昆虫、両生類、爬虫類、鳥類、他の動物、ネコ、イヌ、げっ歯類、霊長類、ヒト、および他の哺乳動物)において存在し得る。

30

#### 【0057】

変異IRP-2タンパク質またはそのフラグメントをコードする核酸(前章中に記載される)は、変異IRP-2タンパク質または変異IRP-2タンパク質のフラグメントを発現する組換え構築物を作製するために、分子生物学における慣用技術を使用して操作され得る。これらのポリペプチドまたはその誘導体としては、主要なアミノ酸配列として、配列表(配列番号4、6、8、10、12、14および16)に実質的に示される全てのアミノ酸配列、および機能的に等価なアミノ酸残基がサイレント変化をもたらす配列内の残基と置換される改変配列を含む少なくとも3アミノ酸長の配列番号4、6、8、10、12、14および16のフラグメントを一次アミノ酸配列として含むものが挙げられるが、これらに限定されない。配列番号4、6、8、10、12、14および16の配列の好ましいフラグメントは、少なくとも3つのアミノ酸であり、そして機能的に等価なアミノ酸配列がサイレント変化をもたらす配列内の残基と置換される改変配列を含む変異IRP-2タンパク質に特有のアミノ酸配列を含む。変異IRP-2ペプチドフラグメントは、前記ペプチドが変異IRP-2タンパク質に特有である(配列番号2と比較して)アミノ酸を有する限りは、例えば、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、

40

50



58、 59、 60、 61、 62、 63、 64、 65、 66、 67、  
68、 69、 70、 71、 72、 73、 74、 75、 76、 77、  
78、 79、 80、 81、 82、 83、 84、 85、 86、 87、  
88、 89、 90、 91、 92、 93、 94、 95、 96、 97、  
98、 99、 および 100より少ないか、または等しいアミノ酸長であり得る。

#### 【0058】

本発明の実施形態は、多くの判定基準（酸化される能力の喪失（*inability*））、ユビキネート化（*ubiquitinated*）される能力の喪失、およびプロテオソーム分解に対して安定に存在し続ける能力を含むが、これらに限定されない）のいずれかによって判断される場合、配列番号4、6、8、10、12、14および16に記載されるヌクレオチド配列によってコードされる変異IRP-2タンパク質に機能的に等価であるタンパク質を包含する。このように機能的に等価な変異IRP-2タンパク質は、上に記載される変異IRP-2ヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列内のアミノ酸残基の付加または置換を含む（しかし、これに限定されない）が、これはサイレントな変化をもたらし、それゆえ機能的に等価な遺伝子産物を産生する。例えば、実施形態としては、機能的等価物として作用する類似した極性を有する別のアミノ酸によって置換される（サイレントな変化を生じる）、配列番号4、6、8、10、12、14および16の変異IRP-2ポリペプチドならびに配列番号4、6、8、10、12、14および16のフラグメント内の、1つ以上のアミノ酸残基を有する変異IRP-2タンパク質が挙げられる。この配列内のアミノ酸に対する置換は、そのアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択され得る。例えば、非-極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが挙げられる。極性中性アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが挙げられる。正に帯電した（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、リシン、およびヒスチジンが挙げられる。負に帯電した（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。芳香族アミノ酸としては、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンが挙げられる。

#### 【0059】

変異IRP-2ポリペプチドは、*Merrifield*ら、*J. Am. Chem. Soc.* 85:2149 (1964), *Houghten*ら、*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82:5132 (1985), *Stewart and Young Solid phase peptide synthesis*, *Pierce Chem. Co.*, *Rockford, IL* (1984), and *Creighton*, 1983, *Proteins: Structures* および *Molecular Principles*, *W. H. Freeman & Co.*, *N.Y.* (本明細書中で参考として援用される)によって記載されるような当該分野で公知の技術を使用する化学合成法（固相ペプチド合成のような）によって調製され得る。このようなポリペプチドは、そのアミノ末端にメチオニンを含んで、または含まないで合成され得る。変異IRP-2タンパク質およびそのフラグメントは、天然の精製変異IRP-2タンパク質および変異IRP-2タンパク質のフラグメントに対する生物学的に活性な、または免疫学的な代用物（*substitute*）として使用され得る。

#### 【0060】

変異IRP-2タンパク質は化学的に合成され得るが、当該分野で周知の技術を使用する組換えDNA技術によってこれらのポリペプチドを生産することの方がより効率的であり得る。このような方法が使用され、例えば変異IRP-2ヌクレオチド配列および適切な転写および翻訳制御シグナルを含む発現ベクターが構築され得る。これらの方法としては、例えば、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、および*in vivo*遺伝子組換えが挙げられる。あるいは、変異IRP-2ヌクレオチド配列をコードし得るRNAは、例えば合成装置を使用して、化学的に合成され得る。例えば、*Oligonucle*

10

20

30

40

50

otide Synthesis, 1984, Gait, M. J. 編、IRL Press, Oxford (本明細書中でその全体が参考として援用される)を参照のこと。

#### 【0061】

いくつかの実施形態において、変異IRP-2タンパク質および変異IRP-2タンパク質のフラグメントは、細胞株において発現される。例えば、配列番号4、6、8、10、12、14および16のIRP-2ポリペプチドまたは配列番号4、6、8、10、12、14および16のフラグメントを発現させるために、いくつかの細胞が作製される。これらの実施形態を含む配列、構築物、ベクター、クローン、および他の物質は、有利には濃縮または単離形態であり得る。本明細書中で使用される場合、「濃縮された(enriched)」は、その物質の濃度がその天然濃度の少なくとも2、5、10、100、または1000倍(例えば)、有利には0.01重量%、好ましくは少なくとも約0.1重量%である。約0.5%、1%、5%、10%、および20%(重量)からの濃縮調製物もまた企図される。用語「単離された(isolated)」は、その物質がその本来の環境(例えば、もしそれが天然に存在するならば、天然の環境)から取り除かれることを必要とする。例えば、生きている動物において存在する天然に存在するポリヌクレオチドは単離されていないが、天然系において共存する物質のいくつかまたは全てから分離された同一のポリヌクレオチドは単離されている。配列が精製形態で存在することもまた好都合である。用語「精製された(purified)」は、絶対的な純度を必要とせず；むしろ相対的な定義として意図される。単離されたタンパク質は、慣用的に、例えばCoomassie染色によって電気泳動的同質性(electrophoretic homogeneity)に至るまで精製されてきた。出発物質または天然物質の少なくとも1桁(order of magnitude)、好ましくは2または3桁、そしてさらに好ましくは4または5桁までの精製が、明白に企図される。

#### 【0062】

様々な宿主-発現ベクターが使用され、変異IRP-2タンパク質および変異IRP-2タンパク質のフラグメントが発現され得る。変異IRP-2タンパク質または変異IRP-2タンパク質のフラグメントが可溶性誘導体である場合、これは培養物から(すなわちそのペプチドまたはポリペプチドが分泌されない場合において宿主細胞から、またそのペプチドまたはポリペプチドが細胞によって分泌される場合において培養培地から)回収され得る。しかしながら、発現系としては、また、in situにおける(すなわち細胞膜中に固定される(anchored))変異IRP-2タンパク質および変異IRP-2タンパク質のフラグメントまたは機能的等価物を発現する遺伝子操作宿主細胞(engineered host cells)が挙げられる。このような発現系からの変異IRP-2タンパク質またはそのフラグメントの精製または濃縮は、適切な界面活性剤および脂質ミセルならびに当業者に周知の方法を使用して、達成され得る。しかしながら、このような遺伝子操作宿主細胞自体は、変異IRP-2タンパク質の構造的および機能的特徴の維持するためだけではなく、生物学的活性を評価するために重要である状況で使用され得る。

#### 【0063】

使用され得る発現系としては、IRP-2ヌクレオチド配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換される微生物(バクテリア(例えば、E. coliまたはB. subtilis)のような)；変異IRP-2ヌクレオチド配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換される酵母(例えば、Saccharomyces, Pichia)；変異IRP-2配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、baculovirus)で感染される昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV)で感染されるか、もしくは変異IRP-2ヌクレオチド配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換される、植物細胞系；または哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター(例えば、メタロチオネイ

ンプロモーター)、または哺乳動物のウイルスに由来するプロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター; ワクシニアウイルス 7.5 K プロモーター)を含む組換え発現構築物を有する哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3)が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0064】

バクテリア系においては、発現される変異IRP-2遺伝子産物に意図される使用に依存して、多くの発現ベクターが好都合に選択され得る。例えば、大量なこのようなタンパク質が産生される場合(野生型または変異IRP-2タンパク質あるいは野生型または変異IRP-2タンパク質のフラグメントに対する抗体の惹起のために)、例えば容易に精製される高レベルな融合タンパク質産物の発現を導く(direct)ベクターが所望され得る。このようなベクターとしては、E coli発現ベクターpUR278(Rutherfordら、EMBO J., 2:1791(1983)、(ここで、変異IRP-2タンパク質または変異IRP-2タンパク質フラグメントコーディング配列は、lacZコーディング領域とインフレーム(in frame)でベクター内に個別に連結され得、それによって融合タンパク質が産生される); pINベクター(Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res., 13:3101-3109(1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem., 264:5503-5509(1989)); などが挙げられるが、これらに限定されない。pGEXベクターもまた使用され、外来ポリペプチドをグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として発現し得る。一般的に、このような融合タンパク質は可溶性であり、そしてグルタチオン-アガロースビーズへの吸収、それに続く遊離グルタチオンの存在下での溶出によって溶解細胞より精製され得る。PGEXベクターはトロニンまたはファクターXaプロテアーゼ開裂部位を含むよう設計され、それによってクロン化された標的遺伝子産物はGST部分から放出され得る。

#### 【0065】

昆虫系においては、外来遺伝子を発現するためのベクターとして、オートグラフィカルニカ核多角体ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)(AcNPV)が使用される。このウイルスは、Spodoptera frugiperda細胞内で成長する。変異IRP-2タンパク質または変異IRP-2タンパク質のフラグメント核酸配列は、個別にそのウイルスの非-必須領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)へクローニングされ、そしてAcNPVプロモーター(例えば、ポリヘドリンプロモーター)の制御下に置かれ得る。コーディング配列の挿入の成功は、結果的にポリヘドリン遺伝子の不活性化および非-閉鎖(non-occluded)組換えウイルス(すなわち、ポリヘドリンによってコードされるタンパク質様コートを欠くウイルス)の産生をもたらす。次いで、挿入遺伝子が発現されるSpodoptera frugiperda細胞を感染させるために、これらの組換えウイルスが使用される。(例えば、Smithら、J. Virol 46:584(1983); およびSmith、米国特許第4,215,051号を参照のこと。)

哺乳動物細胞において、多くのウイルス-ベースの発現系が利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合、目的のヌクレオチド配列はアデノウイルス転写/翻訳制御複合体(例えば、後期プロモーターおよび3部分リーダー配列(tripartite leader sequence))に連結され得る。次いで、このキメラ遺伝子が、in vitroまたはin vivo組換えによってアデノウイルスゲノム中に挿入され得る。ウイルスゲノムの非-必須領域(例えば、領域E1またはE3)における挿入は、結果的に、感染宿主内において生存可能でありかつIRP-2遺伝子産物を発現し得る組換えウイルスをもたらす(例えば、Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659(1984)を参照のこと。)。特定の開始シグナルもまた、挿入された変異IRP-2ヌクレオチド配列の効率的な翻訳のために必要であり得る。これらのシグナルとしては、ATG開始コドンおよ

び隣接配列が挙げられる。全 I R P - 2 遺伝子または c D N A ( それ自体の開始コドンおよび隣接配列を含む ) が適切な発現ベクターへ挿入される場合、さらなる翻訳制御シグナルは必要とされない。

#### 【 0 0 6 6 】

しかしながら、変異 I R P - 2 タンパク質コーディング配列の一部のみが挿入される場合、外来性の翻訳制御シグナル ( おそらく、A T G 開始コドンを含む ) が供給されるべきである。さらに、その開始コドンは、その全インサートの翻訳を確実にするために、所望されるコード配列のリーディングフレームと位相を合わせられるべきである。これらの外来性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは様々な起源 ( 天然および合成の両方 ) を有し得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどの包含によって促進され得る。 ( 例えば、B i t t n e r ら、M e t h o d s i n E n z y m o l , 1 5 3 : 5 1 6 - 5 4 4 ( 1 9 8 7 ) を参照のこと。 )

さらに、挿入配列の発現を調節するか、または所望される特定の仕方で遺伝子産物を改変およびプロセッシングする宿主細胞株が選択され得る。タンパク質産物のこのような改変 ( 例えば、グリコシル化 ) およびプロセッシング ( 例えば、開裂 ) は、タンパク質の機能にとって重要である。種々の宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の後 - 翻訳プロセッシングおよび改変に対して特徴的且つ特有のメカニズムを有する。発現される外来性タンパク質の正確な改変およびプロセッシングを確実にを行うために、適切な細胞株または宿主システムが選択され得る。この目的のため、遺伝子産物の一次転写、グリコシル化、およびリン酸化の適切なプロセッシングのための細胞機構を有する真核生物宿主細胞が使用され得る。このような哺乳動物宿主細胞としては、C H O、V E R O、B H K、H e L a、C O S、M D C K、2 9 3、3 T 3、および W 1 3 8 が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 6 7 】

組換えタンパク質の長期的で高収率な産生のためには、安定な発現が好ましい。例えば、野生型または変異 I R P - 2 タンパク質またはそのフラグメントを安定に発現する細胞株が操作される。ウイルス性の複製起点を含む発現ベクターを用いるよりも、むしろ、宿主細胞は適切な発現制御エレメント ( 例えば、プロモーター、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など ) および選択マーカーによって制御される D N A を用いて形質転換され得る。外来性 D N A の導入に続いて、遺伝子操作される細胞は濃縮された培地中で 1 - 2 日間増殖され、次いで選択培地にスイッチされる。組換えプラスミド中の選択マーカーは、選択に対する耐性を与え、そして細胞がプラスミドをそれらの染色体に安定に組み込み、そして次にはクローニングされ且つ細胞系へ拡大されるフォーカスを形成するまで増殖することを可能にする。この方法は、野生型または変異 I R P - 2 タンパク質またはそのフラグメントを発現する細胞系を遺伝子操作するために好都合に使用される。

#### 【 0 0 6 8 】

多くの選択系が使用され得る ( 単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ ( W i g l e r ら、C e l l 1 1 : 2 2 3 ( 1 9 7 7 )、ヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ ( S z y b a l s k a & S z y b a l s k i , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 4 8 : 2 0 2 6 ( 1 9 6 2 )、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ ( L o w y ら、C e l l 2 2 : 8 1 7 ( 1 9 8 0 ) 遺伝子 ( これらに限定されない ) は、それぞれ t k<sup>+</sup>、h g p r t<sup>+</sup> または a p r t<sup>+</sup> 細胞において使用され得る )。また、抗代謝物耐性が、以下の遺伝子のための選択の基礎として使用され得る : d h f r ( これはメトトレキサートに対する耐性を与える ) ( W i g l e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 7 7 : 3 5 6 7 ( 1 9 8 0 ) ; O ' H a r e ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i , U S A 7 8 : 1 5 2 7 ( 1 9 8 1 ) ; g p t ( これは、ミコフェノール酸に対する耐性を与える ) ( M u l l i g a n & B e r g , P r o c . N a t l . A c a d . S c i , U S A 7 8 : 2 0 7 2 ( 1 9 8 1 ) ; n e o ( これは、アミノグリコシド G - 4 1 8 に対する耐性を与える

10

20

30

40

50

) (Colberre - Garapinら、J. Mol. Biol. 150: 1 (1981); および hygro (これは、ハイグロマイシンに対する耐性を与える) (Santierreら、Gene 30: 147 (1984))。

#### 【0069】

あるいは、任意の融合タンパク質が、発現される融合タンパク質に特異的な抗体を利用することによって容易に精製され得る。例えば、Janknechtらによって記載される系は、ヒト細胞系において発現する非 - 変性融合タンパク質の容易な精製を可能にする。(Janknechtら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972 - 8976 (1991))。この系において、目的の遺伝子は、遺伝子のオープンリーディングフレームが6個のヒスチジン残基から成るアミノ - 末端タグへ翻訳的に融合されるように、ワクシニア組換えプラスミドへサブクロニングされる。組換えワクシニアウイルスに感染した細胞からの抽出物は  $\text{Ni}^{2+}$  ニトリロ酢酸 - アガロースカラムにかけられ、そしてヒスチジン - タグ化タンパク質がイミダゾール含有緩衝液を用いて選択的に溶出される。

10

#### 【0070】

変異IRP - 2遺伝子産物またはそのフラグメントはまた、トランスジェニック生物を作り出すために、植物、昆虫、および動物において発現され得る。ほとんど全ての種の植物または昆虫がこれらの分子を発現するように作製され得る。野生型または変異IRP - 2またはそのフラグメントを有する所望のトランスジェニック植物系としては、例えば、シロイヌナズナ(Arabidopsis)、メイズ(maize)、およびクラミドモナス(chlamydomonas)が挙げられる。野生型または変異IRP - 2またはそのフラグメントを有する所望の昆虫系としては、例えば、D. melanogaster および C. elegans が挙げられる。任意の種の動物としては、両生類、爬虫類、鳥類、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、マイクロピッグ(micro-pigs)、ヤギ、イヌ、ネコ、およびヒト以外の霊長類(例えば、ヒヒ、サル、およびチンパンジー)が使用され、変異IRP - 2トランスジェニック動物が作り出され得る。トランスジェニック生物は、望ましくは、変異IRP - 2タンパク質またはそのフラグメントの生殖系列的な伝達(germline transfer)を示す。いくつかのトランスジェニック生物は、1つ以上の存在するIRP - 2遺伝子の完全なノックアウトまたは点突然変異を示す。例えば、1つの実施形態において、トランスジェニック動物は、アミノ酸残基136 - 216に相当するIRP - 2のペプチドループ内(および、好ましくは配列番号2に提供される領域内)のシステイン残基において、少なくとも1つの点突然変異を含む。最も好ましいトランスジェニック動物実施形態は、配列番号4、6、8、10、12、14および16に提供される変異IRP - 2フラグメントに類似する突然変異を有する。

20

30

#### 【0071】

当該分野で公知の任意の技術が好ましく使用され、変異IRP - 2トランスジェニック動物へ導入され、トランスジェニック動物の初代の系(founder line)が作製され得るか、または存在するIRP - 2遺伝子がノックアウトまたは置換され得る。このような技術としては、前核マイクロインジェクション(Hoppe, P. C. and Wagner, T. E., 1989, 米国特許第4, 873, 191号); 生殖細胞系へのレトロウイルス媒介型遺伝子導入(Vander Puttenら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82: 6148 - 6152 (1985)); 胚性幹細胞中の遺伝子ターゲティング(Thompsonら、Cell 56: 313 - 321 (1989)); 胚の電圧クランプ法(Lo, Mol. Cell. Biol. 3: 1803 - 1814 (1983)); および精子媒介型遺伝子導入(Lavitranoら、Cell 57: 717 - 723 (1989)); などが挙げられるがこれらに限定されない。このような技術の総説については、Gordon, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115: 171 - 229 (1989) (その全体が本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

40

50

## 【0072】

本発明は、それら全ての細胞において変異IRP-2トランスジーンを有するトランスジェニック動物、および全ての細胞ではないがいくつかにおいてトランスジーンを有する動物（すなわち、モザイク動物）を提供する。このトランスジーンは、単一なトランスジーンとしてか、またはコンカテマー（例えば、head-to-headタンデム、head-to-tailタンデム）で組み込まれ得る。トランスジーンは、また、例えば、Laskoら（Lasko, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236 (1992)）の教示に従って、特定の細胞型に選択的に導入され、そしてその中において活性化され得る。このような細胞型特異的な活性化に必要な調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、そして当業者に明らかであろう。

10

## 【0073】

変異IRP-2遺伝子トランスジーンが内因性変異IRP-2遺伝子の染色体部位へ組み込まれることが望ましい場合、遺伝子ターゲティングが好ましい。簡単には、このような技術が利用される場合、染色体配列との相同組換えを介して内因性変異IRP-2遺伝子のヌクレオチド配列へ組み込まれ、そしてその機能を破壊する目的のために、内因性変異IRP-2遺伝子に相同的ないくつかのヌクレオチド配列を含むベクターが設計される。このトランスジーンはまた、例えば、Guら（Guら、Science 265: 103-106 (1994)）の教示に従い特定の細胞型へ選択的に導入され得、このようにしてその細胞型だけにおいて内因性変異IRP-2遺伝子を不活性化する。このような細胞型特異的な不活性化に必要な調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、そして当

20

## 【0074】

一旦トランスジェニック動物が作製されると、例えば、標準的な技術を使用して組換え変異IRP-2遺伝子の発現がアッセイされ得る。最初のスクリーニングは、トランスジーンの組み込みが行われたか否かをアッセイするために、動物組織を分析するためのサザンブロット分析またはPCR技術によって成し遂げられ得る。トランスジェニック動物の組織中のトランスジーンのmRNA発現のレベルは、動物から得られる細胞のノーザンブロット分析、in situハイブリダイゼーション分析、およびRT-PCRが挙げられるがこれらに限定されない技術を使用して評価され得る。変異IRP-2遺伝子発現細胞のサンプルは、変異IRP-2トランスジーン産物に対して特異的な抗体を使用して、免疫細胞化学的に評価され得る。

30

## 【0075】

天然に存在するポリペプチド実施形態に加え、より望ましい細胞応答を産生する誘導または改変分子も本発明の範囲内である。例えば、誘導型変異IRP-2分子としては、より大きな酸化を受ける誘導体の形成を促進させるためにタンパク質へ組み込まれる1つ以上のシステイン残基を有するように操作されたポリペプチドが挙げられる。ポリペプチド内のシステイン残基の導入は、慣用的な分子生物学的技術を使用して成し遂げられ得る。

## 【0076】

さらなる実施形態としては、変異IRP-2ポリペプチドに似ている擬ペプチドが挙げられる。ペプチドの生物学的産生において使用される天然に存在するアミノ酸は、全てL-立体配置（L-configuration）をとる。合成ペプチドは、L-アミノ酸、D-アミノ酸、または2つの異なる立体配置のアミノ酸の様々な組み合わせを利用する慣用的な合成方法を使用して、調製され得る。特定のペプチド（例えば、オリゴペプチド）（かつてこのようなペプチドが見出された）のコンフォメーションおよび所望の特徴を真似るが所望されない特徴（例えばフレキシビリティ（コンフォメーションの損失）および結合崩壊）を回避する合成化合物は、「擬ペプチド」として知られる。（例えば、Spatola, A. F. Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins (Weinstein, B, 編.), Vol. 7, pp. 267-357, Marcel Dekker, New York (1983)（これは、エンケファリンアナログにおけるアミド置換

40

50

の場合のメチレンチオバイオイソスター (bioisostere) [ $\text{CH}_2\text{S}$ ] の使用を記載する) ; および Szelke ら、In peptides: Structure and Function, Proceedings of the Eighth American Peptide Symposium, (Hruby and Rich, 編) ; pp. 579 - 582, Pierce Chemical Co., Rockford, ILL. (1983) (これは、アンギオテンシノゲンに由来する 6 - 13 オクタペプチド中の Leu - Val アミド結合におけるメチレンアミノ [ $\text{CH}_2\text{NH}$ ] およびヒドロキシエチレン [ $\text{CHOHCH}_2$ ] バイオイソスターの両方を有するレニン阻害剤を記載する) を参照のこと)。

#### 【0077】

一般的に、擬ペプチドの設計および合成は、ペプチドのアミノ酸配列および所望のペプチド (例えば、最もありそうなシミュレートされたペプチド) のコンフォメーションデータ (例えば、結合距離および角度のような幾何学的データ) を用いて出発することを包含する。次いで、このデータは、擬ペプチドへ設計されるべき幾何学を決定するために使用される。この工程を実施することについて多くの方法および技術が当該分野において知られており、そのいずれかが使用され得る。(例えば、Farmer, P. S., Drug Design, (Ariens, E. J. 編), Vol. 10, pp. 119 - 143 (Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney and San Francisco) (1980) ; Farmer ら (TIPS, 9/82, pp. 362 - 365 において) ; Verber ら (TINS, 9/85, pp. 392 - 396 において) ; Kaltenbronn ら (J. Med. Chem. 33: 838 - 845 (1990) において) ; および Spatola, A. F., in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Vol. 7, pp. 267 - 357, Chapter 5, 「Peptide Backbone Modifications: A Structure-Activity Analysis of Peptides Containing Amide Bond Surrogates. Conformational Constraints, and Relations」 (B. Weisten 編; Marcel Dekker: New York, pub.) (1983) において) ; Kemp, D. S., 「Peptidomimetics and the Template Approach to Nucleation of  $\alpha$ -sheets and  $\alpha$ -helices in Peptides」, Tibbich, Vol. 8, pp. 249 - 255 (1990) を参照のこと)。さらなる技術は、米国特許第 5, 288, 707 ; 5, 552, 534 ; 5, 811, 515 ; 5, 817, 626 ; 5, 817, 879 ; 5, 821, 231 ; および 5, 874, 529 号において見出され得る。以下の章は、野生型または変異 IRP - 2 タンパク質またはそのフラグメントに向けられた抗体の調製および使用を記載する。

#### 【0078】

##### 抗 - IRP - 2 抗体

IRP - 2 タンパク質またはその一部分の合成または発現および単離または精製に続いて、この単離または精製されたタンパク質が使用され、モノクローナルまたはポリクローナル抗体あるいは両方が作製され得る。その内容に依存して、用語「抗体」は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、Fab フラグメント、および Fab 発現ライブラリーによって産生されるフラグメントを包含し得る。変異または野生型 IRP - 2 蛋白質またはそのフラグメントを認識する抗体は、多くの用途 (バイオテクノロジー的適用、治療的 / 予防的適用、および診断的適用が挙げられるがこれらに限定されない) を有する。

#### 【0079】

抗体の産生のために、種々の宿主 (ヤギ、ウサギ、ラット、マウスなどが挙げられる) が、変異または野生型 IRP - 2 タンパク質または免疫原性特性を保持する任意の部分、フ

10

20

30

40

50

ラグメントまたはオリゴペプチドを用いる注入によって免疫され得る。宿主の種に依存して、免疫学的応答を増大させるために種々のアジュバントが使用され得る。このようなアジュバントとしては、Freund's、ミネラルゲル（水酸化アルミニウムのような）、および表面活性物質（リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、スカシガイヘモシアニン（keyhole limpet hemocyanin）（KLH）、およびジニトロフェノールが挙げられるが、これらに限定されない。BCG（Bacillus Calmette - Guerin）およびCorynebacterium parvumもまた、潜在的に有用なアジュバントである。

#### 【0080】

特異的な抗体を誘導するために使用されるペプチドは、少なくとも3個のアミノ酸、そして好ましくは少なくとも10から15個のアミノ酸から成るアミノ酸配列を有し得る。好ましくは、変異または野生型IRP-2タンパク質のフラグメントをコードするアミノ酸の短い構造がスカシガイヘモシアニン（KLH）のような別のタンパク質と融合され、その結果キメラ分子に対して抗体が産生される。変異または野生型IRP-2タンパク質を特異的に認識し得る抗体は、変異または野生型IRP-2タンパク質のタンパク質配列に相当する合成3-mer、10-merおよび15-merペプチドをマウスに注入することによって生成され得るが、一方より多様な抗体のセットは、組換え変異型または野生型IRP-2タンパク質またはそのフラグメントを用いることによって生成され得る。

#### 【0081】

変異または野生型IRP-2タンパク質あるいはそのフラグメントに対する抗体を生成するために、トランスフェクションまたは形質転換細胞から十分に純粋なタンパク質が単離される。最終調製物中のポリペプチドの濃度は、例えばAmiconフィルター装置での濃縮によって、数マイクログラム/mlのレベルに調整される。次いで目的のポリペプチドに対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体は、以下のように調製され得る：モノクローナル抗体は、培養物中の継代細胞系（continuous cell line）による抗体分子の産生のために提供される任意の技術を使用して調製され得る。これらとしては、Koehler and Milstein（Nature 256：495-497（1975））によって初めて記載されるハイブリドーマ技術、ヒトB-細胞ハイブリドーマ技術（Kosborら、Immunol Today 4：72（1983）；Coteら、Proc Natl Acad Sci 80：2026-2030（1983）、およびEBV-ハイブリドーマ技術（Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss Inc, New York N.Y., pp 77-96（1985））が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術（適切な抗原特異性および生物学的活性を有する分子を得るためのマウス抗体遺伝子のヒト抗体遺伝子へのスプライシング）が使用され得る（Morrissonら、Proc Natl Acad Sci 81：6851-6855（1984）；Neubergerら、Nature 312：604-608（1984）；Takedaら、Nature 314：452-454（1985））。あるいは、単鎖抗体の産生について記載される技術（米国特許第4,946,778号）が適用され、変異または野生型IRP-2タンパク質に特異的な単鎖抗体が産生され得る。抗体はまた、リンパ球集団におけるin vivo産生を誘導することによって、またはOrlandiら、Proc Natl Acad Sci 86：3833-3837（1989）、and Winter G. and Milstein C；Nature 349：293-299（1991））に開示される様な非常に特異的な結合試薬のパネルまたは組換えイムノグロブリンライブラリーをスクリーニングすることによって、産生され得る。

#### 【0082】

変異または野生型IRP-2タンパク質あるいはそのフラグメントに対する特異的結合部位を含む抗体フラグメントもまた、生成され得る。例えば、このようなフラグメントとし

10

20

30

40

50



ては、抗体分子のペプシン消化によって生産され得る  $F(ab')_2$  フラグメントおよび  $F(ab')_2$  フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成され得る  $Fab$  フラグメントが挙げられるがこれらに限定されない。あるいは、 $Fab$  発現ライブラリーが構築され、所望の特異性を有するモノクローナル  $Fab$  フラグメントの迅速且つ容易な同定を可能にし得る。(Huse W, D.ら、Science 256:1275-1281(1989))。

#### 【0083】

1つの方法によって、モノクローナルは以下のように作製される。簡単には、マウスをそれに由来する数マイクログラムの選択タンパク質またはペプチドで数週間の期間に渡って繰り返し接種する。次いでマウスは殺され、そして脾臓の抗体産生細胞が単離される。この脾臓細胞はポリエチレングリコールの存在下でマウス骨髄腫細胞と融合され、過剰な未融合細胞はアミノプテリンを含む選択培地(HAT培地)上での系の生育によって死滅される。首尾よく融合された細胞は希釈され、そしてその希釈物のアリコートで培養物の生育が継続されるマイクロタイタープレートのウェル中に置かれる。抗体産生クローンは、イムノアッセイ方法(ELISAのような)(Engvall, E., Meth. Enzymol. 70:419(1980))によって初めて記載される)およびその誘導的方法によるウェルの上澄流体の中の抗体の検出によって、同定される。選択陽性クローンが拡張され(expanded)、そして使用のためにモノクローナル抗体産物が回収され得る。モノクローナル抗体産生についての詳細な手順は、Davis, L.ら、Basic Methods in Molecular Biology Elsevier, New York. Section 21-2において記載される。

10

20

#### 【0084】

単一タンパク質の異種起源のエピトープに対する抗体を含むポリクローナル抗血清は、適切な動物を前記のそれに由来する発現タンパク質またはペプチド(これは未改変であるか、または免疫原性を促進するように改変され得る)で免疫することによって調製され得る。効果的なポリクローナル抗体産生は、抗原および宿主種の両方に関連する多くの因子によって影響される。例えば、小さい分子は、他よりも低い免疫原性の傾向にあり、そしてキャリアおよびアジュバントの使用を必要とし得る。また、宿主動物は接種の部位および用量に応じて変化し、抗原の不十分または過剰な用量の両方ともが、結果的に低い力価の抗血清をもたらす。複数の皮内部位へ投与される少ない用量(ngレベル)の抗原が最も信頼できるようである。ラビットのための効果的な免疫プロトコールは、Vaitukaitis, J.ら、J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:988-991(1971)において見出され得る。

30

#### 【0085】

ブースター注入が規則的な間隔で行われ得、そして抗血清はその抗体力価(例えば、既知濃度の抗原に対するアガー中の二重免疫拡散分散法によって半-定量的に決定されるような)が低下し始めるときに回収される。例えば、Ouchterlony, O.ら: Handbook of Experimental Immunology D. Wier(編) Blackwell (1973)中の19章を参照のこと。抗体のプラトー濃度は、通常0.1から0.2mg/ml血清(約12 M)の範囲内である。抗原に対する抗血清の親和性は、競合結合曲線を作成することによって決定される(例えば、Fisher, D., : Manual of Clinical Immunology, 2d Ed. (Rose and Friedman, Eds.) Amer. Soc. For Microbiol., Washington, D.C. (1980)中の42章によって記載される)。いずれかのプロトコールに従って調製される抗体調製物は、生物学的サンプル中の抗原保持物質(antigen-bearing substances)の濃度を決定する定量的イムノアッセイにおいて有用である;これらはまた半-定量的または定性的に(例えば、生物学的サンプル中の変異または野生型IRP-2タンパク質の存在を同定する診断実施形態において)使用される。IRP-2の野生型または変異型の酸化および還元型に対して特異的な抗体の調製の例が以下に提供される。下の章は、野

40

50

生型または変異 I R P - 2 核酸およびタンパク質の特性を評価するいくつかの I R P - 2 キャラクタライゼーションアッセイを記載する。実施例 1 は、野生型または変異 I R P - 2 に特異的な抗体を作製およびスクリーニングするために使用される方法を記載し、そして実施例 2 は、野生型 I R P - 2 に特異的な抗体を作製およびスクリーニングするために使用される類似方法を記載する。

#### 【0086】

I R P - 2 キャラクタライゼーションアッセイ

用語「I R P - 2 キャラクタライゼーションアッセイ」または「I R P - 2 機能アッセイ」または「機能的アッセイ」としては、細胞内の野生型または変異 I R P - 2 核酸またはタンパク質の存在、ならびに膜と結合する、別の分子（例えばユビキチン）と相互作用する、および/または鉄-依存的酸化およびプロテオソーム分解を受ける野生型または変異 I R P - 2 タンパク質の能力を直接的または間接的に評価するアッセイが挙げられる。

10

#### 【0087】

いくつかの機能的アッセイとしては、多重結合因子を利用する結合アッセイが挙げられる。多重結合因子の1つの形態は、支持体上に配置される野生型または変異 I R P - 2 タンパク質あるいはそのフラグメントを含む製品に関する。これらの多重結合因子は、このような形態においてか、あるいは十分な親和性が達成されるこのような方法において、野生型または変異 I R P - 2 タンパク質あるいはそのフラグメントを提供する。野生型または変異 I R P - 2 タンパク質あるいはそのフラグメントを有する多重結合因子は、所望のポリペプチドをマクロ分子支持体に結合させることによって得られる。「支持体」は、キャリア、タンパク質、樹脂、細胞膜、またはこのような分子を結合または固定化するために使用される任意のマクロ分子構造を表し得る。固体支持体としては、反応トレイのウェルの壁、試験管、ポリスチレンビーズ、磁気ビーズ、ニトロセルローストリップ、膜、微粒子（ラテックス粒子のような）、動物細胞、Duracyte（登録商標）、人工細胞などが挙げられるがこれらに限定されない。野生型または変異 I R P - 2 タンパク質あるいはそのフラグメントは、例えば、ヒドロキシ、カルボキシまたはアミノ基およびキャリア上の反応性基を介する共有結合によって、無機キャリア（酸化シリコン材料（例えば、シリカゲル、ゼオライト、珪藻土、アミノ化ガラス（aminated glass）のような）へ結合され得る。

20

#### 【0088】

いくつかの多重結合因子において、マクロ分子支持体は、疎水性非-共有結合的相互作用によって野生型または変異 I R P - 2 タンパク質あるいはそのフラグメントの一部と相互作用する疎水性表面を有する。いくつかの場合において、支持体上の疎水性表面はポリマー（プラスチック、または疎水性基が結合されている任意の他のポリマー（ポリスチレン、ポリエチレンまたはポリビニルのような）である。さらに、野生型または変異 I R P - 2 タンパク質あるいはそのフラグメントは、キャリア（タンパク質およびオリゴ/ポリサッカリド（polysaccharides）（例えば、セルロース、澱粉、グリコーゲン、キトサンまたはアミノ化セファロース（aminated sepharose）が挙げられる）に共有結合的に結合され得る。これらの後者の多重結合因子においては、分子上の反応性基（ヒドロキシまたはアミノ基）が用いられ、共有結合を作り出すようにキャリア上の反応性基へ結合される。さらなる多重結合因子は、野生型または変異 I R P - 2 タンパク質ならびにそのフラグメントを結合させるように、化学的に活性化された他の反応性基を有する支持体を含む。例えば、臭化シアン活性型マトリックス、エポキシ活性型マトリックス、チオおよびチオプロピルゲル、ニトロフェニルクロロホルメートおよび N - ヒドロキシスクシンイミドクロロホルメート結合、あるいはオキシランアクリリック支持体が使用される（Sigma）。

30

40

#### 【0089】

さらに、いくつかの実施形態において、リポソームまたは脂質二重層（天然または合成）が支持体として企図され、そして野生型または変異 I R P - 2 タンパク質あるいはそのフラグメントが膜表面に結合されるか、またはリポソーム工学における技術によって膜へ組

50

み込まれる。1つの方法によって、リボソーム多重結合支持体は、表面上で暴露される野生型または変異IRP-2タンパク質あるいはそのフラグメントを含む。疎水性ドメインは、膜との相互作用を促進させるように、野生型または変異IRP-2タンパク質あるいはそのフラグメントへ結合され得る。

#### 【0090】

目的のポリペプチドのより大きなフレキシビリティを促進し且つそれにより支持体によってもたらされ得る任意の立体障害を克服するために、(例えば、ファージのフレキシブル領域に似るように遺伝子操作された「リンカー」のような)野生型または変異IRP-2タンパク質またはそのフラグメントと支持体との間の適切な長さのリンカーの挿入もまた、企図される。最適な細胞応答またはその欠如を可能にするリンカーの適切な長さの決定は、本開示中で詳述されるアッセイ法においてリンカーを変化させながら野生型または変異IRP-2タンパク質またはそのフラグメントをスクリーニングすることによって、決定され得る。

10

#### 【0091】

他の実施形態において、上で議論される多重結合支持体は、「多重結合化された-多重結合支持体(multimerized-multimeric support)」を作製するために、多重結合化された野生型または変異IRP-2タンパク質またはそのフラグメントを結合し得る。例えば、多重結合化リガンドは、分子生物学における慣習技術を用いてタンデムの2つ以上のポリペプチドをカップリングすることによって得られ得る。野生型または変異型IRP-2タンパク質あるいはそのフラグメントの多重結合化形態は、例えば高い親和性を有する因子を得る能力ゆえに、多くの適用について好都合である。多重結合化因子を組み立てる個々のドメイン間のリンカーまたはスペーサー(フレキシブルリンカーのような)の組み込みもまた、いくつかの実施形態について好都合であり得る。適切な長さのリンカーの挿入は、その分子においてより大きなフレキシビリティを促進し得、そして立体障害を克服し得る。同様に、多重結合化された野生型または変異IRP-2タンパク質またはそのフラグメントと支持体との間のリンカーの挿入は、より大きなフレキシビリティを促進し、そして支持体によってもたらされる立体障害を制限する。リンカーの適切な長さの決定は、野生型または変異IRP-2タンパク質あるいはそのフラグメント上のエピトープに対する抗体を用いて、リンカーを変化させながら野生型または変異IRP-2タンパク質あるいはそのフラグメントをスクリーニングすることによって決定され得る。実施例3は、抗-IRP抗体またはそのフラグメント(実施例1または2に従って作製される)をビーズへ結合させるために使用された方法を記載する。

20

30

#### 【0092】

従って、野生型または変異IRP-2タンパク質あるいはそのフラグメントと相互作用する因子を同定するためのいくつかの方法は、前記の支持体-結合因子を用いる。一旦、支持体-結合因子が得られると、例えば分子(例えば、抗体またはユビキチン)がその支持体結合因子へ接触され、そして結合が直接的(例えば、標識抗体またはユビキチンを用いることによって)または間接的(例えば、抗-IRP-2抗体またはユビキチンに対する標識抗体を用いることによって)に決定される。いくつかのアッセイにおいて、支持体結合された野生型または変異IRP-2を酸化または還元した後に、これをユビキチンのような結合パートナーへ接触させることが望ましい。当業者は、支持体-結合型IRP-2タンパク質またはそのフラグメントを酸化する多くの他の方法を認識するであろうが、このような酸化は、十分な濃度の鉄(例えば、 $\text{FeCl}_3$ )の存在下において達成され得る。IRP-2を酸化させるための方法は、その全体が本明細書中で参考として明白に援用されるIwaira、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95:4924(1998)中に提供される。

40

#### 【0093】

1つのキャラクタライゼーションアッセイにおいて、例えば、変異支持体結合型IRP-2ペプチドの酸化またはユビキチン化を受ける能力が、野生型支持体-結合型IRP-2ペプチドの酸化またはユビキチン化を受ける能力と比較される。1つの方法によって、支

50

持体結合型 I R P - 2 の酸化は、20 : 1 反応混合液 ( 25 mM H e p e s - N a O H ( p H 7 . 2 ) および 40 mM K C I ) 中で 0 . 1 : g / : 1 タンパク質の濃度にて、50 : M F e C l <sub>3</sub> および 10 mM D T T の存在下において、37 で 15 - 30 分間行われる。いくつかの実施形態において、トリス - カルボキシエチル - ホスフィン ( T C E P ) を 1 mM で使用し、D T T の代わりにジスルフィドを還元することが所望される。特に、還元型 I R P - 2 が所望される場合、好ましくは T C E P ( 1 mM ) が、鉄を含有しない反応混合液中で 15 - 30 分間 37 にて使用される。

#### 【 0 0 9 4 】

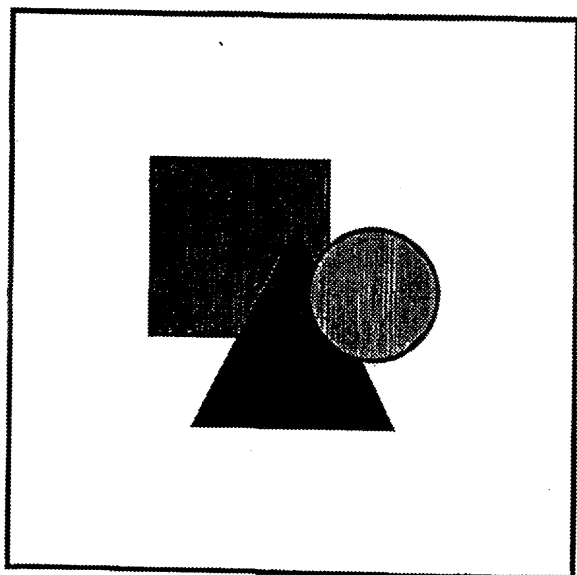
一旦酸化型および / または還元型 I R P - 2 支持体が作製されると、i n v i t r o ユビキチン化アッセイが以下のように行われ得る。酸化型および / または還元型支持体 - 結合野生型および変異 I R P - 2 は、400 : g R D 4 S 100 溶解物、5 mM M g C l <sub>2</sub>、2 mM A T P、2 mM D T T、6 : g ユビキチン、25 mM トリス - C l ( p H 7 . 6 ) および 60 mM K C I へ 5 分間添加される。反応は、1 % N P - 40、0 . 5 % デオキシコラート、50 mM T r i s - C l ( p H 8 . 0 )、150 mM N a C l および 0 . 1 % S D S を含む氷冷緩衝液を添加することによって停止される。この支持体結合複合体はこの緩衝液で 3 回洗浄され ; ピーズは洗浄の合間に 1500 x g でスピンドウンされる。このピーズは、2 x L a e m m e l l i 緩衝液中で 10 分間煮沸され、さらに適切な S D S P A G E ( 例えば、6 % - 15 % ) 上で分離される。この分離タンパク質はエレクトロブロッティングによって膜へ移され、そしてユビキチンの存在がアフニティー精製されたポリクローナルまたはモノクローナル抗 - ユビキチン抗体を用いるウエスタンブロッティングによって実証され得る。このアッセイは、酸化および還元型の変異および野生型 I R P - 2 のユビキチンと相互作用する能力を実証する。

#### 【 0 0 9 5 】

別の方法によって、野生型または変異型支持体結合型 I R P - 2 ペプチドが酸化され ( 例えば H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> または鉄への暴露 )、そして放射標識されたユビキチンと相互作用する支持体結合型因子の能力が測定される。コントロールとしては、T C E P を用いて還元される支持体結合型因子が挙げられる。例えば、支持体結合された野生型および変異 I R P - 2 タンパク質のアリコートが、プロテイナーゼおよびイソペプチダーゼの阻害剤の混合物 ( 5 mM E D T A、10 μ M ヘミン、1 mM 4 - ( 2 - アミノエチル ) ベンゼンスルホニルフルオリド、1 mM E - 64、および 2 μ g / m l アプロチニン、および 10 mM ヨードアセトアミド ) を含む 50 mM トリス - H C l ( p H 7 . 6 ) 中の 0 . 02 mM、0 . 05 mM、0 . 07 mM、および 0 . 1 mM H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> に、5 , 10 , 15 および 30 分間暴露される。次に、このアッセイを 50 μ l の最終体積 ( 50 mM トリス - H C l ( p H 7 . 6 )、5 mM M g C l <sub>2</sub>、1 mM D T T、2 mM A M P - P N P、2 μ g の <sup>125</sup> I - ユビキチン ( 約

#### 【 0 0 9 6 】

#### 【 数 1 】



10

## 【0097】

10<sup>6</sup> cpmにて)、1 μM ユビキチンアルデヒド、および30 μlの支持体結合型IRP-2(約10 mgのタンパク質/mlを含む)にした。

20

## 【0098】

37で20分間のインキュベーションに続いて、この支持体結合型IRP-2-ユビキチン複合体は、1500×gで30秒間スピンドウンされ、そして50 mM Tris-HCl(pH 7.6)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、2 mM AMP-PNP中にて洗浄される。この洗浄手順は3回繰り返される。支持体結合型IRP-2と関連する放射活性がシンチレーションによって測定され得る。この方法は、変異または野生型IRP-2ポリペプチドと結合し得るユビキチンの量を直接的に検出する。

## 【0099】

あるいは、前記の反応は、50 μlの2×Laemmli緩衝液の添加、および100での10分間の煮沸によって停止され得る。続いて、このタンパク質は15% SDS-PAGE上で分離される。このタンパク質は、エレクトロブロットによってナイロンへ転写され、さらにこの膜は乾燥される。この膜は2-4日間フィルムへ暴露され、続いて抗-IRP-2抗体を用いるノーザンブロットが行われる。結合型抗体の検出はまた、例えば金またはセイヨウワサビペルオキシダーゼに結合する二次抗体を用いて達成され得る。この方法では、ユビキチンおよびIRP-2タンパク質の両方が検出される。ユビキチン複合体のレベルはまた、オートラジオグラムのデンシトメトリーによって定量化され得る。

30

## 【0100】

さらに、細胞に基づくキャラクタライゼーションアッセイが行われ得る。例えば、変異および/または野生型IRP-2タンパク質を発現させるために、COS細胞がトランスフェクションされ得る。(例えば、野生型IRP-2を発現させるためにCOS細胞をトランスフェクションするためのプロトコールについては、その全体が本明細書中で参考として明白に援用されるSamaniegoら、J. Biol. Chem., 269:30904(1994)を参照のこと。形質転換体を選択した後、陽性発現細胞のアリコートは、酸化的ストレス下に置かれる。1つの方法によって、酸化的ストレスは、培地中のクエン酸第二鉄アンモニウム(ferric ammonium citrate)を400: g/mlまで上昇させることによってもたらされる。別の方法によって、酸化的ストレスへの暴露は、0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む血清-およびフェノールレッド-フリーな培地中において、30分間成し遂げられる。この細胞は、即時に回収されるか、またはこの細胞を酸化的ストレスから回復させるためのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>または鉄-フリーな培地中で培養される。コントロール細胞は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>または鉄が培地中に含まれていないこと以外、暴露

40

50

細胞と正確に同じように処理される。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> または鉄への暴露後の細胞の生存率は、トリパンブルーおよび3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド染色の排除によってモニターされ得る。還元されたグルタチオンのレベルもまた測定され得る。さらに、細胞内のATPのレベルは、生物発光体細胞アッセイキット(bioluminescent somatic cell assay kit)(Sigma)を製造元の指示書に従って用いることによってモニターされ得る。

#### 【0101】

次いで細胞は、0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> または鉄への30分間の暴露の後に回収され、そしてプロテイナーゼおよびイソペプチダーゼの阻害剤の混合物(5 mM EDTA、10 μM ヘミン、1 mM 4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド、1 mM E-64、および2 μg/ml アプロチニン、および10 mM ヨードアセトアミド)を含む50 mM トリス-HCl(pH 7.6)でホモジナイズされる。SDS-PAGE(8%)分離およびニトロセルロースへの転写の後、プロットはユビキチンに対するアフィニティー精製ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体でプローブされ、その後<sup>125</sup>I-プロテインAと共にインキュベーションされる。ユビキチンおよびユビキチン複合体は、オートラジオグラフィーによって検出され、また画像分析によって定量化される。

#### 【0102】

あるいは、細胞が回収され、そして50 mM トリス、1 mM DTT(pH 7.6)中でホモジナイズされる。細胞上清中のユビキチン複合活性は、内因性タンパク質基質と外因性<sup>125</sup>I-標識ユビキチンとの間の複合体形成を触媒する能力として定量化される。このアッセイは、50 μlの最終体積(50 mM トリス-HCl(pH 7.6)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、2 mM AMP-PNP、2 μgの<sup>125</sup>I-ユビキチン(約10<sup>6</sup> cpm)、1 μM ユビキチンアルデヒド、および30 μlの細胞上清(約10 mgのタンパク質/ml)を含む)において行われる。この反応は、30 μlの細胞上清の添加で開始される。37℃にて20分間のインキュベーションに続いて、この反応は、50 μlの2×Laemmli緩衝液の添加によって停止される。100℃で10分間の煮沸の後、20 μlの混合液中のタンパク質が、15% SDS-PAGEによって分離される。ネガティブコントロールのために、AMP-PNPが4.5ユニットのヘキソキナーゼおよび12 mM 2-デオキシグルコースで置き換えられて、平行実験が行われる。ゲルを乾燥した後、これを2-4日間フィルムへ暴露する。ユビキチン複合体のレベルは、オートラジオグラムのデンシトメトリーによって定量化され得る。前記のキャラクタライゼーションアッセイを使用することによって、変異または野生型IRP-2タンパク質の酸化およびユビキチン化を受ける能力が容易に決定され得る。(IRP-2ユビキチン複合体解析に適応され得るさらなるユビキチンアッセイについては、その全体が本明細書中で参考として明白に援用されるShangら、J. Biol. Chem. 272: 23086(1997)をまた参照のこと。)

本明細書中の開示を考えると、当業者は、このようなアッセイが様々な型のIRP-2タンパク質のプロテオソーム分解について選択される能力を評価し、そして神経変性疾患に関係するIRP-2の型を同定するために使用され得ることを認識するであろう。以下の開示において、いくつかの診断実施形態が記載される。

#### 【0103】

##### 診断的实施形態

一般的に、診断的实施形態は、それが核酸またはタンパク質-ベースアッセイのいずれであるかによって分類され得る。いくつかの診断的アッセイは、IRP-2核酸またはタンパク質における変異または多型(これは、酸化、ユビキチン化、およびプロテオソーム分解における異常の一因となる)を検出する。他の診断アッセイは、疾患を患う生物中の変異および/または野生型IRP-2 RNAまたはタンパク質のレベルと似た変異および/または野生型IRP-2 RNAまたはタンパク質のレベルを試験生物中で検出するこ

10

20

30

40

50

と、あるいは疾患を患っていない生物中の変異および／または野生型 I R P - 2 のレベルと異なる変異および／または野生型 I R P - 2 R N A またはタンパク質のレベルを試験生物中で検出することによって、酸化、ユビキチン化、およびプロテオソーム分解における欠陥を同定および識別する。

#### 【 0 1 0 4 】

さらに、神経変性疾患の迅速な検出および同定を可能にするために、試薬を含むキットの製造および以下の実施形態に記載される方法が企図される。診断キットは、核酸プローブまたは抗体あるいはその組み合わせ（これらは特に、I R P - 2 核酸もしくはタンパク質の変異または野生型を検出する）或いは核酸プローブまたは抗体またはそれらの組み合わせ（これらは、野生型または変異 I R P - 2 の R N A またはタンパク質発現のレベルを測定するために使用され得る）を含み得る。これらのキットの検出成分は、代表的に、以下の試薬の 1 つ以上を組み合わせで供給される。D N A、R N A、またはタンパク質を吸収、もしくは別の方法で結合し得る支持体がしばしば提供されるであろう。利用可能な支持体としては、正に荷電する置換基のアレイを保持することで特徴づけられ得るニトロセルロース、ナイロン、または誘導型ナイロンの膜が挙げられる。1 つ以上の制限酵素、コントロール試薬、緩衝液、増幅酵素、非 - ヒトポリヌクレオチド様ウシ - 胸腺またはサケ - 精子 D N A、およびキットの中の道具を用いて神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病）を診断するための方法を記載する一連の指示書もまた、供給され得る。

10

#### 【 0 1 0 5 】

有用な核酸 - ベースの診断的技術としては、直接的な D N A 配列決定、サザンブロット分析、一本鎖コンファメーション解析 ( s i n g l e - s t r a n d e d c o n f i r m a t i o n a n a l y s i s ) ( S S C A ) , R N A s e プロテクションアッセイ、ドットブロット分析、核酸増幅、およびこれらの方法の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。これらの分析の出発点は、生物学的サンプルから単離または精製された核酸である。被験体からの血液が適切な生物学的サンプルであることが企図される。さらに、変異または多型 I R P - 2 の存在を決定するよう診断的アッセイが設計され、D N A の任意の供給源（毛髪、頬細胞、および皮膚細胞を含むがこれらに限定されない）が生物学的サンプルとして使用され得る。核酸は、サンプルから抽出され、そして酸化、ユビキチン化、およびプロテオソーム分解における欠陥の一因となる多型として認識されるアミノ酸残基をコードする D N A に隣接する領域に相当するプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) のような D N A 増幅技術によって増幅され得、それによって神経変性疾患の診断を提供する。

20

30

#### 【 0 1 0 6 】

一旦十分な量の D N A が試験される個体から得られると、I R P - 2 多型を検出するために、いくつかの方法が使用され得る。直接的な D N A 配列決定（手動配列決定または自動蛍光配列決定のいずれか）は、このような配列の変化を検出し得る。別の方法は、一本鎖コンファメーション多型アッセイ ( S S C A ) である（その全体が本明細書中で参考として明白に援用される O r i t a ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 86 : 2776 - 2770 ( 1989 ) ）。しかしながら、この方法は、全ての配列変化を検出するわけではないが（特に、その D N A フラグメントのサイズが 200 塩基対より大きい場合）、ほとんどの D N A 配列変化を検出するように最適化され得る。

40

#### 【 0 1 0 7 】

検出感度の低下は不都合であるが、S S C A を用いて可能になるスループットの増大がこれを変異検出のための直接的な配列決定法に対する魅力的で現実的な代替法にする。次に、D N A 配列変化の正確な性質を決定するために、S S C A ゲル上でシフトされた移動度を有するフラグメントが配列決定される。2 つの相補的な D N A 鎖間のミスマッチの検出に基づく他の方法としては、均一変性ゲル電気泳動 ( c l a m p e d d e n a t u r i n g g e l e l e c t r o p h o r e s i s ) ( C D G E ) ( S h e f f i e l d ら、A m . J . H u m . G e n e t . 49 : 699 - 706 ( 1991 ) ）、ヘテロ二本鎖分析 ( H A ) ( W h i t e ら、G e n o m i c s 12 : 301 - 306 ( 1992 ) )

50

、および化学ミスマッチ開裂法 (chemical mismatch cleavage) (CMC) (Grompeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5855-5892 (1989)) が挙げられる。DNA配列変化を検出する現在利用可能な方法の総説は、Grompe, Nature Genetics 5: 111-117 (1993) に見出され得る。

#### 【0108】

多型の存在を確かめるための核酸 - ベースの7つの公知の方法が以下に記載される。例示的な目的のためのみに提供され、本発明のいかなる局面を限定することは意図されない、これらの方法としては：

- (1) 一本鎖コンフォメーション分析 (SSCA) (Orिताら) ; 10
- (2) 変性勾配ゲル電気泳動 (DGGE) (Wartellら、Nucl. Acids Res. 18: 2699-2705 (1990) および Sheffieldら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 232-236 (1989)) (共に本明細書中で参考として援用される) ;
- (3) RNAseプロテクションアッセイ (Finkelsteinら、Genomics 7: 167-172 (1990) および Kinszlerら、Science 251: 1366-1370 (1991)) (共に本明細書中で参考として援用される) ;
- (4) ヌクレオチドミスマッチを認識するタンパク質 (E. Coli mutSタンパク質のような) の使用 (Modrich, Ann. Rev. Genet. 25: 229-253 (1991)) (本明細書中で参考として援用される) ; 20
- (5) 対立遺伝子 - 特異的PCR (Rano and Kidd, Nucl. Acids Res. 17: 8392 (1989)) (本明細書中で参考として援用される) (これは、それらの3'末端で多型に対してハイブリダイズするプライマーの使用を伴い、もし多型が存在しないならば、増幅産物は観察されない) ; および
- (6) 増幅無反応性変異システム (Amplification Refractory Mutation System) (ARMS) (欧州特許出願公開番号0332435号およびNewtonら、Nucl. Acids Res. 17: 2503-2516 (1989)) (共に本明細書中で参考として援用される) において開示されるような) ; および
- (7) 一時的温度勾配ゲル電気泳動 (temporal temperature gradient gel electrophoresis) (TTGE) (本明細書中で参考として援用されるU.S./E.G. Bulletin 2103においてBio-Radによって記載される) が挙げられる。 30

#### 【0109】

SSCA、DGGE、TTGEおよびRNAseプロテクションアッセイにおいて、多型が存在する場合、新たな電気泳動バンドが現れる。SSCAおよびTTGEは、この配列変化が一本鎖分子内塩基対合における差異 (これは、電気泳動的に検出される) をもたらすゆえに異なって移動するバンドを検出する。RNAseプロテクションは、変異ポリヌクレオチドの2つ以上のより小さなフラグメントへの開裂を伴う。DGGEは、変性勾配ゲルを使用して配列の移動速度における差異を検出する。対立遺伝子 - 特異的オリゴヌクレオチドアッセイ (ASOs) (Connerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 278-282 (1983)) においては、オリゴヌクレオチドが特異的配列を検出するように設計され、そしてハイブリダイゼーションシグナルの存在または非存在を検出することによってアッセイが行われる。mutSアッセイにおいて、タンパク質は、多型性と非多型性配列との間のヘテロ2本鎖におけるヌクレオチドミスマッチを含む配列に対してのみ結合する。ミスマッチ (この言葉のこの意味において) は、2つの鎖が100%相補的なわけではないハイブリダイズされた核酸2本鎖をいう。全相同性の欠如は、例えば非 - 多型性鎖にハイブリダイズした生物学的サンプルから得られるアンプリコン中の1つ以上の多型の存在に起因する。ミスマッチ検出は、DNAまたはmRNA中の点突然変異を検出するために使用され得る。これらの技術は配列決定法に比べて 40 50



低感度であるが、一方これらは多くの生物学的サンプルに対して容易に行われ、またアレイ技術に適用できる ( a m a n a b l e ) 。

#### 【 0 1 1 0 】

いくつかの実施形態において、野生型 I R P - 2 をコードするポリヌクレオチドを変異 I R P - 2 と区別する核酸プローブが規則正しいアレイで支持体に結合される ( ここで、この核酸プローブは互いに重ならない支持体の異なる領域へ結合される ) 。好ましくは、このような規則正しいアレイは、プローブの異なる位置が記録され且つアッセイ手順の一部としてアクセスされ得る「アドレスで呼び出し可能な ( a d d r e s s a b l e ) 」よう設計される。これらのプローブは、異なる既知の位置において支持体に結合される。各核酸プローブの正確な位置の情報は、これらの「アドレスで呼び出せる」アレイを結合アッセイにおいて特に有用なものにする。いくつかの生物学的サンプルの調製物からの核酸は、慣用的な方法 ( 例えば、放射活性または蛍光 ) によって標識され、そして標識サンプルは、ハイブリダイゼーションを可能にする条件下においてアレイへ適用される。

10

#### 【 0 1 1 1 】

サンプル中の核酸がアレイ上のプローブにハイブリダイズする場合、シグナルは、ハイブリッドの位置に相当する支持体上の位置で検出されるであろう。各標識サンプルのアイデンティティが既知であり且つ標識サンプルが適用される支持体上の領域が既知であるので、多型変異体の存在の同定は、容易に決定され得る。これらの方法は、高スループットな診断的または検出分析の当業者に公知の技術を使用して、容易に自動化される。

20

#### 【 0 1 1 2 】

さらに、上記に示される方法と逆の方法が使用され得る。アドレスで呼び出せるアレイを作製するために、生物学的サンプル中に存在する核酸が支持体上に配置され得る。好ましくは、重ならない既知の位置で支持体上にサンプルが配置される。各サンプル中の所望の多型を有する核酸の存在は、その多型をコードする相補的な核酸の標識核酸プローブを適用し、さらに生物学的サンプルが配置される位置に相当するアレイ上の位置におけるシグナルの存在を検出することによって、決定される。生物学的サンプルのアイデンティティおよびアレイ上の位置が分かるので、多型変異体の同定は迅速に決定され得る。これらの方法は、高スループットな診断的分析の当業者に公知の技術を使用して、容易に自動化される。

30

#### 【 0 1 1 3 】

当該分野で公知の任意のアドレスで呼び出し可能なアレイ技術が、本発明のこの局面と共に使用され得る。ポリヌクレオチドアレイの1つの特定の実施形態は、Gene chips<sup>TM</sup> として知られており、そして米国特許第 5, 143, 854 号 ; P C T 公開番号 W O 90 / 15070 および 92 / 10092 において一般的に記載される。これらのアレイは、一般的に、フォトリソグラフィ法と固相オリゴヌクレオチド合成法との組み合わせを併せる機械的合成法または光学的合成法 ( l i g h t d i r e c t e d s y n t h e s i s m e t h o d s ) を使用して作製される。( F o d o r ら、S c i e n c e , 251 : 767 - 777 , ( 1991 ) ) 。固体支持体上のオリゴヌクレオチドのアレイの固定化は、「超大規模固定化ポリマー合成法 ( V e r y L a r g e S c a l e I m m o b i l i z e d P o l y m e r S y n t h e s i s ) 」 ( V L S P I S<sup>TM</sup> ) ( 代表的に、プローブがチップの固体表面上に高密度なアレイで固定化される ) として一般的に認識される技術の開発によって可能になった。V L S P I S<sup>TM</sup> 技術の例は、米国特許第 5, 143, 854 号および第 5, 412, 087 号において、および P C T 公開番号 W O 90 / 15070、W O 92 / 10092 および W O 95 / 11995 ( これらは、光学的合成技術のような技術を通じてオリゴヌクレオチドアレイを形成するための方法を記載する ) において提供される。固体支持体上に固定化されるヌクレオチドのアレイを提供することを目的とする設計方法において、ハイブリダイゼーションパターンおよび診断的情報を最大限にするための試みとして、チップ上のオリゴヌクレオチドアレイを整列および表示するためのさらなるプレゼンテーション方法が開発された。このようなプレゼンテーション方法の例は、P C T 公開番号 W O 94 / 12305、W O

40

50

94/11530、WO 97/29212およびWO 97/31256に記載される。

#### 【0114】

広く多様な標識および複合技術が当業者によって知られており、そして種々の核酸アッセイにおいて使用され得る。オリゴラベリング、ニックトランスレーション、エンド-ラベリング、または標識ヌクレオチドを用いるPCR増幅を含むハイブリダイゼーションまたはPCRのための標識核酸を生産するためのいくつかの方法が存在するがこれらに限定されない。あるいは、IRP-2をコードする核酸が、mRNAプロブの産生のためのベクター中へクローニングされ得る。このようなベクターは当該分野で公知であり、また市販されており、適切なRNAポリメラーゼ(T7、T3またはSP6のような)および標識ヌクレオチドを添加することによって、*in vitro*においてRNAプロブを合成するために、使用され得る。多くの会社(Pharmacia Biotech (Piscataway N.J.)、Promega (Madison Wis.)、およびU.S. Biochemical Corp (Cleveland Ohio))が市販用のキットおよびこれらの手順に関するプロトコルを提供する。適切なレポーター分子または標識としては、放射性ヌクレオチド、酵素、蛍光、化学発光、または色素産生試薬、および基質、コファクター、インヒビター、磁性粒子などが挙げられる。

10

#### 【0115】

RNAseプロテクション法は、上記に簡単に記載したように、アレイ技術に適用できるミスマッチ開裂技術の例である。好ましくは、この方法は、多型を有するIRP-2配列に相補的な標識リボプロブの使用を包含する。しかしながら、この方法は、野生型遺伝子を有するIRP-2配列に相補的な標識リボプロブの使用を伴う。リボプロブおよび生物学的サンプルから単離または増幅されるmRNAまたはDNAのどちらか一方がアニールされ(ハイブリダイズされ)、そして引き続き酵素RNAse A(これは、二重鎖RNAse構造におけるミスマッチを検出し得る)を用いて消化される。ミスマッチがRNAse Aによって検出される場合、多型改変体はサンプル中に存在せず、またこの酵素はミスマッチの部位で切断し、リボプロブを破壊する。従って、アニールするRNAが電気泳動ゲルマトリックス上で分離されるとき、もしミスマッチが検出され且つRNAse Aによって開裂されるならば、RNA産物は、そのリボプロブおよびmRNAまたはDNAについての全長二重鎖RNAよりも非常に小さく見えるであろう。

20

30

#### 【0116】

リボプロブに対する相補物は、また、アレイ上に分散され、そして任意の残存ハイブリッドを変性させた後にRNAse A消化からの産物を用いてストリンジェントにプロブされ得る。この場合において、もしミスマッチが検出され且つプロブがRNAse Aによって破壊されるならば、アレイ上の相補物は、分解されたRNAとストリンジェントな条件下においてアニールしないであろう。類似する方法において、酵素的または化学的開裂を通じてミスマッチを検出するために、DNAプロブが使用され得る。例えば、Cottonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397(1988); Shenkら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:989(1975); および Novackら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:586(1986)を参照のこと。ミスマッチはまた、マッチ二重鎖に対してミスマッチ二重鎖の電気泳動能力におけるシフトによって検出され得る。(例えば、本明細書中で参考として援用されるCarriello, Human Genetics 42:726(1988)を参照のこと)。前記の技術のいずれかを使用して、多型を有するIRP-2の領域に相当する試験生物由来のmRNAまたはDNAが、ハイブリダイゼーションの前にPCRによって増幅され得る。

40

#### 【0117】

タンパク質サンプル中のIRP-2多型または野生型配列の存在は、また、慣用的なアッセイを使用することによって検出され得る。例えば、IRP-2多型と免疫反応性である抗体が使用され、神経変性疾患(例えば、アルツハイマー病)の傾向について生物学的サ

50

ンプルをスクリーニングし得る。さらに、野生型 I R P - 2 を変異 I R P - 2 と区別する抗体が使用され、ある生物が神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病）の傾向を有さないことを決定し得る。好ましい実施形態において、抗体は、溶液から野生型または変異型 I R P - 2 を免疫沈降させるために使用されるか、あるいはウエスタンまたはイムノブロット上で野生型または変異 I R P - 2 と反応させるために使用される。好ましい診断的实施形態としてはまた、酵素結合イムノソルベント検定法（E L I S A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）、イムノラジオメトリックアッセイ（I R M A）および免疫酵素アッセイ（I E M A）（モノクローナルおよび/またはポリクローナル抗体を使用するサンドウィッチアッセイを含む）が挙げられる。例示的に、サンドウィッチアッセイは、本明細書中で参考として援用される米国特許第 4, 376, 110 号および 4, 486, 530 号中に D a v i d らによって記載される。他の実施形態は、その全体が本明細書中で参考として明白に援用される米国特許第 5, 290, 678 号； 5, 604, 105 号； 5, 710, 008 号； 5, 744, 358 号；および 5, 747, 274 号に開示される免疫 - ストリップ（i m m u n e - s t r i p）技術の局面を使用する。

10

#### 【0118】

別の好ましいタンパク質 - ベースの診断において、本発明の抗体は規則正しいアレイで支持体へ結合される（ここで、複数の抗体は、互いに重ならない支持体の異なる領域に結合される）。核酸 - ベースのアレイと同様に、タンパク質 - ベースのアレイは、明確な位置が記録され且つアッセイ手順の一部としてアクセスされ得るように「アドレスで呼び出し可能な」よう設計される規則正しいアレイである。これらのプローブは、異なる既知の位置で支持体に結合される。各プローブの正確な位置の情報は、これらの「アドレスで呼び出し可能な」アレイを結合アッセイにおいて特に有用なものにする。例えば、アドレスで呼び出し可能なアレイは、特定の I R P - 2 タンパク質を特異的に認識し且つ変異および野生型 I R P - 2 タンパク質を区別する複数の抗体プローブを結合されるいくつかの領域を有する支持体を含む。

20

#### 【0119】

従って、タンパク質は生物学的サンプルより得られ、そして慣用的な方法（例えば、放射活性、比色的に、または蛍光的に）によって標識される。標識サンプルは、次いで、結合を可能にする条件下においてアレイに適用される。サンプル中のタンパク質がアレイ上の抗体プローブに結合する場合、抗体 - タンパク質複合体の位置に相当する支持体上の場所でシグナルが検出されるであろう。各標識サンプルのアイデンティティが既知であり、且つ標識サンプルが適用される支持体の領域が既知であるので、存在の同定、濃度、および/または発現レベルが迅速に決定され得る。すなわち、既知濃度の変異または野生型 I R P - 2 タンパク質の標識標準を使用することによって、研究者は、試験サンプル中の特定の I R P - 2 タンパク質のタンパク質濃度を正確に測定し得、そしてまた特定の型の I R P - 2 タンパク質の発現レベルを評価し得る。特定の I R P - 2 タンパク質の濃度または発現レベルをより正確に決定するために、デンストメトリーにおける慣用的な方法が使用され得る。これらの方法は、高スループット診断的分析の当業者に公知の技術を使用して、容易に自動化される。

30

#### 【0120】

別の実施形態において、上記に示したものと逆の方法が使用され得る。アドレスで呼び出し可能なアレイを作製するために、生物学的サンプル中に存在するタンパク質が支持体上に配置され得る。好ましくは、このタンパク質サンプルは、重ならない既知の位置で支持体上に配置される。各サンプル中の変異または野生型 I R P - 2 タンパク質をコードするタンパク質の存在は、次いで、I R P - 2 タンパク質の変異または野生型形態に特異的なエピトープを認識する標識抗体プローブを適用することによって決定される。生物学的サンプルのアイデンティティおよびアレイ上の位置が分かっているので、特定の多型の存在の同定、濃度、および/または発現レベルは迅速に決定され得る。

40

#### 【0121】

すなわち、既知濃度の変異および/または野生型 I R P - 2 タンパク質の標識標準を使用

50

することによって、研究者は、サンプル中の I R P - 2 タンパク質の濃度を正確に決定し得、そしてこの情報から特定の型の I R P - 2 タンパク質の発現レベルを評価し得る。I R P - 2 タンパク質の濃度または発現レベルをより正確に決定するために、デンストメトリーにおける慣用的な方法が使用され得る。これらの方法はまた、高スループット診断分析の分野における当業者に公知の技術を使用して、容易に自動化される。上記に詳述するように、当該分野において公知の任意のアドレスで呼び出し可能なアレイ技術は、本発明のこの局面と共に使用され得、そして抗体結合パターンおよび診断的情報を最大限にする試みにおいて、チップ上のタンパク質アレイを提示する。

#### 【0122】

別の診断的实施形態において、本明細書中でその全体が参考として明白に援用される米国特許第 5, 290, 678 号; 5, 604, 105 号; 5, 710, 008 号; 5, 744, 358 号; および 5, 747, 274 号において開示される免疫-ストリップ技術が適応され、野生型または変異 I R P - 2 タンパク質に対する抗体によって認識される抗原を提示する。次いで、これらの抗原提示免疫ストリップが使用され、種々の型の I R P - 2 タンパク質に対する抗体の存在について生物学的サンプルが分析され得る。野生型または変異 I R P - 2 ペプチドまたはタンパク質はこれらの実施形態にとって好ましい抗原であるけれども、これらの分子に似た擬ペプチドが使用され得る。これらの擬ペプチド-ベースの実施形態は、よりプロテアーゼ耐性であり得、また多くの適用についてストリップ (stripped) および使用され得る。好ましくは、擬ペプチド-ベースの I R P - 2 アレイが作り出され (例えば、野生型または変異 I R P - 2 タンパク質に似た擬ペプチドを有する遺伝子チップ)、そして生物学的サンプルの大きなパネルをスクリーニングするために使用される。

10

20

#### 【0123】

別の好ましい方法において、神経変性疾患についての危険性があると疑われる被験体に由来する血液サンプルが得られ、そして野生型 I R P - 2 タンパク質および/または変異型の I R P - 2 タンパク質上のエピトープに向けられた抗体を使用するフローサイトメトリー (FACS) によって分析される。蛍光標識二次抗体 (例えば、フルオレシシン複合化ヤギ抗-ヒト IgG) を使用する標準的フローサイトメトリー技術および市販の細胞固定化および透過化キット (PermaCytel-FP) が使用されるであろう。従って、再懸濁細胞は抗-I R P - 2 抗体および二次抗体と反応させられ、そしてその免疫複合体は FACS の前に通される。細胞は、蛍光の分布および定量についてモニターされるであろう。野生型および/または変異型 I R P - 2 タンパク質に特異的な抗体を使用することによって、種々の型の I R P - 2 タンパク質の存在および量の決定が迅速に決定され得る。

30

#### 【0124】

上記で議論するように、I R P - 2 分子における多型の存在または検出は、神経変性疾患 (例えば、アルツハイマー病) の診断を提供し得る。さらなる実施形態としては、検出成分 (I R P - 2 の特定の多型変異体に特異的な抗体のような) を含む診断キットの調製が挙げられる。この検出成分は、代表的に、1つ以上の以下の試薬の組み合わせで供給されるであろう。RNA またはタンパク質を吸収または他の方法で結合し得る支持体がしばしば供給されるであろう。この目的のために利用可能な支持体としては、例えば、ニトロセルロース、ナイロンまたは誘導型ナイロン (正に荷電した置換基のアレイを保持することによって特徴づけられる) の膜および Genechip<sup>TM</sup> またはそれらの等価物が挙げられるが、これらに限定されない。1つ以上の酵素 (逆転写酵素および/または Taq ポリメラーゼのような) が、dNTPs、緩衝液、またはウシ胸腺またはサケ精子 DNA のような非-ヒトポリヌクレオチドと同様に、キットの中に備えられ得る。このキットアッセイからの結果は、医療サービス提供者または診断研究室によって解釈され得る。あるいは、診断キットは、製造され、自己診断のために私的な個人に対して販売される。

40

#### 【0125】

I R P - 2 DNA、mRNA、またはタンパク質における多型の存在または非存在に従って疾患を診断することに加え、I R P - 2 の酸化、ユビキチン化、およびプロテオソ-

50

ム分解における欠陥を伴ういくつかの神経変性疾患は、歪んだレベルの変異および野生型 I R P - 2 に起因する。例えば、特定の型の I R P - 2 の発現レベルをモニターすることによって、診断が行われ得、そして疾患状態が同定され得る。すなわち、多くの神経変性疾患は薬用量効果に起因し、ここで、酸化を受け得ない変異 I R P - 2 の過剰が持続する。従って、種々の I R P - 2 の発現レベルの比（例えば、I R P - 2 発現のパターン）を決定することによって、健康または疾患の予後診断が行われ得る。

#### 【0126】

従って、健康個体、および神経変性疾患を患う個体に由来する種々のサンプルにおける I R P - 2 発現のレベルが決定される。このような値はデータベースに記録され、そして試験個体から得られる値と比較され得る。さらに、健康および疾患個体の両方に由来する様々なサンプルにおける I R P - 2 発現の比またはパターンはデータベース中に記録される。これらの分析は、「疾患状態プロフィール」といい、そしてある疾患状態プロフィール（例えば、健康または疾患個体からの）を試験個体からの疾患状態プロフィールと比較することによって、臨床医は、疾患の存在または非存在を迅速に診断し得る。神経変性疾患に罹患するいくつかの個体の I R P - 2 発現の測定値を有するデータベースは、疾患の進行がモニターされ得る価値ある標準である。この方法において、標準と生物値との間の偏差が、疾患状態の重篤度を確立する。

10

#### 【0127】

前記の核酸およびタンパク質 - ベースの診断技術が使用され、組織中の I R P - 2 R N A またはタンパク質の発現のレベルまたは量または比が検出され得る。定量的ノーザンハイブリダイゼーション、*i n s i t u* 分析、免疫組織化学法、E L I S A、遺伝子チップアレイ技術、P C R、およびウェスタンブロットを通じて、例えば、特定の I R P - 2（野生型または変異型）についての R N A またはタンパク質の発現のレベルまたは量が容易に決定され得、そしてこの情報から発現の比が確認され得る。1つの診断方法としては、例えば、疾患状態を有する複数の I R P - 2 アイソフォームの発現レベルの間の比を相互に関連させる方法が挙げられる。この方法を実施するために、神経変性疾患を患う個体に由来する生物学的サンプルおよび正常な個体に由来する生物学的サンプルが得られる。次いで、サンプル中の2つ以上の I R P - 2 タンパク質または I R P - 2 タンパク質をコードする核酸（例えば、I R P - 2 の野生型および変異型）の発現レベルが決定され、そして野生型および変異型 I R P - 2 発現の比と神経変性疾患との間に統計的に有意な関連があるか否かについて分析される。統計的に有意な関連は、当業者に良く知られている統計的方法（*t* 検定および<sup>2</sup> - 解析（*c h i - s q u a r e a n a l y s e s*）が挙げられる）を用いて決定され得る。

20

30

#### 【0128】

一旦様々な I R P - 2 分子のレベルが決定されると、その情報はコンピューターで読み取り可能な媒体（ハードドライブ、フロッピー（登録商標）ディスク、DVDドライブ、*z i p* ドライブなどのような）上に記録され得る。記録および研究される様々な I R P - 2 分子の発現のレベルをふくむデータベースの生成の後、発現の比を作り出すために、様々な I R P - 2 分子の発現のレベルを比較する比較プログラムが使用される。例えば、最初の比較において、変異 I R P - 2 に対する野生型 I R P - 2 の比が生成される。さらに、種々の変異型 I R P - 2 と相互のおよび/または野生型 I R P - 2 との所望の比較が挙げられるがこれらに限定されない。例は、I R P - 2 の酸化されたおよび還元された野生型および変異型に特異的な抗体の調製を記載する。本発明の別の局面は、その種々の *i n v i v o* 状態にある脳鉄（非 - トランスフェリン結合鉄（N T B I）、トランスフェリン結合鉄（T B I）、およびフェリチンおよびヘモシデリンを含む高分子量複合体）を測定および/またはモニターするための磁気共鳴画像法（M R I）を使用するための方法に関する。高解像度の3Dグラディエントエコー画像法、バックグランド場効果の除去を伴う相画像法（S W I）、T2\* シグナル損失の理解、および特別なスピンエコー/グラディエントエコー画像法を使用する磁化率（*s u s c e p t i b i l i t y*）の抽出の統合は、脳鉄の絶対的な定量を導く。

40

50

## 【 0 1 2 9 】

## A . 高解像度 3 D , グラディエントエコー画像法

小さい局所的な場磁化率効果に対する感度を得ることは、長いエコー時間を伴う画像化を必要とする。空気 / 組織境界面によって引き起こされるバックグラウンド場効果は、長いエコー時間の間、これらの部位に隣接する組織において劇的なシグナル損失を導く。以前にも示したように、ボクセルに及ぶ位相のずれは、非常に小さいボクセルを用いることによって減少され得、その結果バックグラウンド ( または他の ) 場からの相変化は 2 未満まで減少する。この操作は、シグナルの劇的な回復をもたらす、そして画像がフィルタされる ( *f i l t e r e d* ) 場合、より高い解像度へ向かう損なわれたシグナル対ノイズの回復をもたらす。これらの結果は、より低い解像度で得られたものとは異なる。この方法は、

10

## 【 0 1 3 0 】

## B . 相画像法およびバックグラウンド場効果の除去

相画像の使用は、脳内の組織間の常磁性の ( または反磁性の ) 差異の存在を評価し始めるための自然な方法である。MR 画像中の相は、 $\phi = \gamma B t$  によって与えられ、ここで、 $\gamma$  は磁気回転比 ( *g y r o m a g n e t i c r a t i o* )、 $B$  はある組織から隣までの磁場における変化、また  $t$  はデータが測定される時間 ( 通常エコー時間  $T E$  ) である。

20

## 【 0 1 3 1 】

これらの相違を視覚化することに伴う問題は、空気 / 組織境界面からのバックグラウンド場効果からの特別な相効果から生じる。主に低空間周波数 ( *l o w s p a t i a l f r e q u e n c y* ) であるバックグラウンド場効果を取り除くために、ハイパスフェーズフィルタ ( *h i g h p a s s p h a s e f i l t e r* ) が開発された。この処理技術を用いて、相画像は劇的に改善された。脳内の酸素飽和および機能的な脳活性化の間の酸素飽和における小さな変化さえもマッピングする ( *m a p* ) ために、この方法が首尾よく使用されてきた ( すなわち、本発明者らは、それらの実験のために使用される特定の 3 D 配列について  $0.03 \text{ ppm}$  (  $0.002$  のエラーを伴う ) と同程度小さい変化を容易に測定することができた )。このことは、 $0.025$  の  $p$  値について、 $0.004$  と同程度の

30

## 【 0 1 3 2 】

全ての直線相効果を取り除くための別の方法は、二重エコー法を使用することである。第一エコーからの相は、バックグラウンド相効果から期待される相の単一直線依存性に基づいて、第二エコーからの相を予測するために使用される。第一エコーの相 (  $\phi_1$  ) に  $T E_2 / T E_1$  を掛けて  $\phi_2$  を予測する場合、この予測される相は第二エコーのものから引き算され ( 複雑な割り算によって達成される )、修正画像の予測される相はゼロであり、また相効果が単に加法的ではない 2 - コンパートメントモデルに関係する任意の非 - 直線的効果を後に残す。この方法は、小さい局所的なピクセル効果を切り離すことを可能にする。

40

## 【 0 1 3 3 】

C .  $T_2^*$  シグナル損失の理解

最近、その供給源がボクセル内に封じ込められる小さな体積である双極子場によって引き起こされる球状ボクセルにおけるシグナル損失の分析的評価が、実施された。長いエコー時間は、シグナルの挙動 ( すなわち、本来非 - 指数関数的であるシグナル変化 ) における顕著な振動 ( *o s c i l l a t i o n* ) を導き得る。 $T_2^*$  強調画像におけるシグナル損

50

失を定量化する試みにおいて、小さいランダムに分配された磁化率変化の局所的な供給源の存在下で、シグナル挙動の予測を可能にする理論が展開された。特に、シグナル変化は、時間起点の近くで本来指数関数的ではなく、また中間の（そして長い）時間ドメイン内にある。この理論が使用され、ランダムな供給源およびボクセル内の体積フラクションの体積磁化率が抽出され得る。この方法の正確な定量的性質は、*in vivo*におけるランダム構造のセットに対して有効ではなかった。

#### 【0134】

脳内の $T_1$ 緩和時間の依存性が研究され、脳内の前頭野が灰白質について最長の $T_1$ を有したが、一方運動皮質に近い領域は最小の $T_1$ 値を有することが明らかにされた。この領域における灰白質および白質でコントラストの損失が生じる。同一領域の相測定は、相と鉄含有率との強い相関関係を明らかにし、運動皮質において最大を示した。本発明は、年齢の関数として、相と脳内鉄含有率との間の相関関係に関する。

10

#### 【0135】

D. 特別なスピネコー/グラディエントエコー画像法を用いる磁化率の抽出 顕微鏡の影響によって引き起こされないスライス (slice) またはボクセルに及ぶバックグラウンド場不均質性 (inhomogeneities) を説明するために、そしてまたrf相デザインへのあらゆる依存性を排除するために、特別な複合グラディエントエコーおよびスピネコー獲得方法が定義された。一連のグラディエントエコーは、スピネコーの周りで集められ、そして以下のようにバックグラウンド場効果を取り除くために使用される。ボクセルを横切り位相をずらすことなく $T_2$ 強調画像の等価物を作製するために、最後のグラディエントエコーは最初のグラディエントエコーイメージで割り算される。一旦 $T_2$ が分かると、多重グラディエントエコーについての $T_2$ の影響が取り除かれ、結果的に $T_2'$ に起因する初期の変化 (磁化率の局所的な供給源によって引き起こされるこれらのシグナル変化) のみが残る。このシグナル依存性は、時間において二次式的な挙動有するように表され、さらにフィットさせると、供給源の体積含有率および磁気モーメントの両方が定量的に抽出され得る。

20

#### 【0136】

本発明の好ましい実施形態において、MR画像はヒトおよび動物を研究するために約1.5 Tおよび4.7 Tで行われるであろう。0.004 ppmと同程度小さい磁化率差異は、 $TE = 40 \text{ ms}$  および  $0.5 \times 1.0 \times 2.0 \text{ mm}^3$  の解像度 (5分間のスキャン時間を必要とする) を伴う3Dグラディエントエコー法を用いて測定され得る。4.7 Tまで行い且つ小さいマウスの脳表面コイルを用いることによって、SNRにおけるおよそ8のファクターが得られ、またボクセルサイズを  $0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$  まで減少させる。もしデータが40分間収集されるならば、このボクセルサイズは、 $0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ mm}$  (これは、このプロジェクトの成功に重要ではないが、マウス脳における構造を区別する際に利益をもたらす) まで減少され得る。

30

#### 【0137】

別の好ましい実施形態は、所定の幾何学を用いて鉄含有率を正確に定量化するMRIの能力を検証するために、既知の磁化率を有するファントム (phantoms) と呼ばれる物質の磁気画像 (MRI) 分析に関する。3つの異なる形状が考えられる: 第1に、単一の試験管が主要な磁場に対して平行または垂直の両方で画像化される; 第2に、薄い平面が画像化される; そして第3に脳実質のひだをより多く表すようにワープされた薄い平面が画像化される。これらの平面は、ヒト脳を真似るように層を2~3 mm厚に切り離すためのマイラーフィルムを用いて作製される。これらのファントムの寸法は、さらにヒト脳を真似るため、そしてまたファントムの正確なチューニングおよびシミングを可能にするため、各側において10 cmのオーダーである。アガロースゲルは、脳内の鉄を真似るような一連の異なる濃度 (最初の  $100 \text{ nmol/gm}$ 、次いで  $500 \text{ nmol/mg}$  で開始して  $500 \text{ nmol/gm} \sim 2000 \text{ nmol/gm}$  のさらに4回の単位) でいくつかの異なる鉄保有化合物を用いてドーブされる充填物質として使用される。各化合物の磁化率は、それらの条件下の相の幾何学の影響が十分に理解されていることから、試験管形状

40

50

を使用して測定された。特に、a)  $\text{FeCl}_3$ 、b)  $\text{FeSO}_4$ 、c) フェリチンおよび d) ヘモシデリンから構成される4つの異なる型のファントムが調製される。ファントム実験は、ランダムな系についての鉄の濃度の影響の研究を可能にする(低濃度は、シグナル損失に指数関数的な影響を有すると予期されるが、高濃度は、より幾何学的に依存性であると予期される)。しかしながら、脳の構造および鉄濃度は、溝相(sulci phase)のような通常の幾何学的効果を有するようには見えず、むしろ一様であり、生じるフォールディングとは無関係であることが見出される。これは、低濃度および、それゆえ物体の形状と無関係に相を測定するための簡単な手段を示し得る。これらの実験は、直線的挙動が存在し且つある場強度から隣までに必要とされる特別な校正が存在しないことを確実にするために、1.5 Tおよび4.7 Tの両方で実行される。従って、ファントムの画像化は、ファントムの各々の内部の既知鉄の濃度に対して、MR画像からの磁化率測定値の相関を可能にする。異なる形状のファントムおよび異なる濃度の様々な鉄分子を用いて試験され得る。実行の前に、ファントムを使用して、ヒトについては1.5 T、また動物については4.7 Tにてシーケンス最適化が行われる。本発明は、動物およびヒトにおける使用のための、およびアルツハイマー脳における時間経過に伴う鉄変化をモニタリングするための鉄定量の方法に関する。

10

#### 【0138】

別の好ましい実施形態は、脳鉄を蓄積し且つMRI技術の検証のための神経変性疾患を患うトランスジェニックマウスの、磁気共鳴画像分析に関する。鉄調節タンパク質-2(IRP2)をコードする欠失体(deletion)で遺伝子操作されるトランスジェニックマウスは、有意なレベルの神経鉄を蓄積することが知られる(La Vautte 2001)。このトランスジェニックマウスは、代表的に運動失調、前庭機能不全 振せん(vestibular dysfunction tremors)およびとりわけ体位異常として現れる6ヶ月齢以内に神経変性症状の発病を示す(La Vautte 2001)。好ましくは、マウスは12時間の明-暗スケジュールで飼育され、市販のペレット状の餌および水へのアクセスは自由である。さらに、マウスは、皮膚、口腔粘膜、行動および神経学的徴候、ならびに体重について毎週観察される。異常な行動を示す動物は、安楽死させた。選択された間隔で、動物は、神経画像化のためにイソフルラン吸入法(4%誘導、1%維持)によって麻酔され、次いでMRI互換性定位装置(MRI compatible stereotactic apparatus)中に置かれる。直腸の温度は、継続的にモニターされ、またその動物の下に設置される温水コイルを用いて $37 \pm 0.5$ に維持される。

20

30

#### 【0139】

最適化MRIシーケンスを用いる新規画像法の知見を正確に相関させるために、4グループのマウスが画像化される。本発明は、マウス脳組織における量および局在の両方による鉄調節タンパク質(IRP-2を含む)のモニタリングに関する。グループは、a) コントロール(C57bl/6)、b)  $\text{Ireb}2^{+/+}$ 、c)  $\text{Ireb}2^{+/-}$ 、およびd)  $\text{Ireb}2^{-/-}$ マウスである。グループは、脳内の鉄蓄積(およびその様々な形態)の影響の包括的な全体像を提供するであろう。以前の研究によって、これらのマウスが18ヶ月齢になるまで脳鉄含有率を連続的に増大させることが実証されてきた。開発される最適化シーケンスを使用して、マウスが1、3、6、9、12、および18ヶ月で継続的に画像化され、脳内の鉄の空間的または時間的な沈着が理解される。最初の画像化グループは定量的組織化学(これは、脳(または、他の組織)内の鉄の様々な形態の絶対的な検証を可能にし、その画像データが鉄の実際のレベルとの相関関係を示し、そして鉄の局所的なレベルおよび変性疾患の基礎へ決定的な見解を提供する画像データと相関関係を示す)のための各時点における6匹の動物の抽出を可能にする程十分に大きかった。

40

#### 【0140】

画像化の前に、マウスは、MRI画像についての移動のアーチファクトを避けるのに十分なレベルまでイソフルランで麻酔される。画像化は、Bruker Advance 4.7 T イメージャー上で、頭部のみの体積コイル(head only volume

50



c o i l ) を用いて行われる。磁場を均質化した後、700msの緩和時間 ( T R ) および20msのエコー時間 ( T E ) を伴い、2獲得 ( a c q u i s i t i o n ) ならびに冠状、矢状および横方向における3スライス ( s l i c e ) を用いて、スピンエコーT1 - 強調スカウト ( s c o u t ) が得られる。10スライス ( 2mmの分離を伴う各2mm厚 ) が、スカウト画像上に海馬 ( ~ 4mm プレグマの後方 ) および梨状皮質 ( プレグマのレベルで ) のレベルで位置づけられる。スピンエコー拡散強調およびマルチ - エコーT2 - 強調データのセットが収集される。拡散 - 強調シーケンスに使用されるパラメーターは、45mm視野 ( F O V ) および128 × 128マトリックスを伴う2獲得を用いる冠状スライスについての2200 / 100ms ( T R / T E ) である。拡散グラディエントはz方向において適用される。見かけの拡散係数 ( A D C ) マップを計算するために1000s / mm<sup>2</sup> のb値が使用される。マルチ - エコーT2 - 強調シーケンスパラメーターは、3000 / 40ms ( T R / T E ) および各々が40ms離れて6エコー ( 3 ~ 5スライスについて1獲得を伴う ) からなる。

10

#### 【0141】

A D C マップは、次の等式によって決定される： $A D C = \ln ( S_0 / S_n ) / b$  ここで、 $S_n$  はDW画像についての平均強度であり、そして $S_0$  は対応する拡散非強調画像 ( d i f f u s i o n u n w e i g h t e d i m a g e ) についての平均強度である { 6032 }。A D C は、マップ中の各ピクセルについて計算される。高いA D C 値はDWマップ上で明るく表わされる。目的の領域 ( R O I ) についてのA D C は、特定面積における全てのピクセルについてのA D C の平均として計算される。T2マップは、6エコーT2シーケンスから生成される。次いでT2緩和定数は、次の等式を用いるデータに対する非線形最小二乗曲線フィットを用いて、各ピクセルについて計算される： $M(t) = M_0(1 - e^{-t/T_2})$  ここで、 $M_0$  は減衰前の初期の磁化値であり、 $t$  はエコー時間 ( m s ) そしてT2はスピン - スピン緩和時間である。

20

#### 【0142】

別の好ましい実施形態は、海馬が下方にカールしたように見られるスライスの直ぐ前の単一スライスにおいて各マウスについて行われる画像分析に関する。この位置は、およそプレグマ - 3 . 60mmに相当し、また各々の目的の領域 ( R O I ) の断面積を最大化する。Cheshire (登録商標) 画像処理ソフトウェア ( H a y d e n I m a g e P r o c e s s i n g G r o u p , W a l t h a m , M A ) は、二次研究者によって確認されるR O I の輪郭を描き且つこれを分析するために、使用される。両側性のR O I としては、扁桃 ( および関係する核 )、梨状皮質 ( 内側および周囲皮質の部分を含む )、海馬、脳梁膨大後方皮質 ( r e t r o s p l e n i a l c o r t e x ) ( 運動および体性感覚皮質を含む ) および視床が挙げられる。2ピクセル幅が海馬および脳梁膨大後方R O I を分ける。線は、脳梁膨大後方R O I の下方の境界を定める皮質の向こう側へ広がる両方の海馬の底を横切って描かれる。梨状および扁桃R O I は互いに隣接しており、上方および下方に同じ距離広がっている。中間的に2 ~ 4ピクセルが扁桃R O I から視床を分離し、側脳室からのシグナル寄与を最小化する。5 × 5ピクセル平方が視床内に中心とされる。3Dグラディエントエコー画像について、このスライスの周辺のスライスからの情報が評価される。

30

40

#### 【0143】

ファントムデータから鉄を抽出する能力は約束されるけれども、動物 ( およびヒト ) 脳における鉄定量は、本質的な多義性によって混同される。鉄型の化学的な識別のために、組織とフェリチン中の鉄、マクロファージおよび - アミロイドプラークの周りの遊離鉄との間のMRIによって見られるような相対的磁化率が試みられる。脳鉄は、相およびT2'画像を使用して定量化され、そしてマウス脳において組織 - 化学的に見出されるものと比較される。プラークに近い血管の中および周辺に鉄が存在することは良く知られている。MR画像は、マウスモデルにおける脳鉄変化と相互に関連付けられ、そして初期のプラーク形成を検出する能力を提供する。

#### 【0144】

50

本発明の別の実施形態において、MRI分析の完了時に、MRI研究を完成させる免疫-組織化学および鉄化学における使用ならびに脳鉄代謝におけるIRP-2の役割の理解を可能にする組み合わせにおける使用を目的として、脳および血液組織の回収、保管、および処理のために、4匹のマウスが安楽死される。血液および脳組織はCO<sub>2</sub>窒息後にマウスから取り除かれる。この血液はグループごとにプールされ、そして白血球を単離し且つ-70で凍結保存される血清サンプルを得るために処理される。この脳は右および左半球に分けられ、重量が湿重量で記録され、そしてランダムに各動物由来の一方の半-脳がp1p(4%緩衝化ホルマリン溶液)中に置かれ、さらに他方の半分が凍結防止剤中に置かれ、そして凍結される。この凍結脳組織が切り分けられ、そして前部(レベル1)、中央(レベル2)、および後部(レベル3)からの各サード切片(every third section)がポリ-1-リジンコートスライド上に置かれる。大脳皮質、側脳室、脳梁および尾状被殻(caudate putamen)がレベル1切片に存在し、大脳皮質、視床、第三脳室および海馬がレベル2切片に存在し、そして小脳、髄質、第四脳室および錐体路がレベル3切片に存在する。33個の5~10mm切片が各半-脳から作製される(以下のものを3通り: H&Eのために1セット、アポトーシスのために1セット、第二鉄分布のためのプルシアンブルー染色のために1セット、および抗-IRP-1、抗-IRP-2、抗-フェリチン、抗-トランスフェリンレセプター、-アミロイドユビキチンおよびヘモシデリンを使用する免疫細胞化学法のために7セット)。3つのさらなる30mm切片(各脳レベルから1つ)は、重量(湿重量)測定され、元素鉄含有物を処理するために真空凍結バッグ中に置かれる。

10

20

#### 【0145】

H&Eおよびマウス組織のアポトーシス測定については、3つの脳レベルの各々に由来する1つの5~10mm組織切片が、組織の形態学的評価のためにH&Eで染色される。各脳組織切片の1セットはGreenら(2001)によって記載されるように改変されるアポダイレクトアッセイ(Apodirect assay)を使用して標識される。核酸の遊離3'末端への末端デオキシヌクレオチジル-トランスフェラーゼ(TdT)媒介蛍光(FITC)-複合化BrdUの取り込みを用いて脳組織における後期アポトーシス事象を評価するために、DNA損傷が使用される。簡単には、組織を-20~70%エタノール中で15分間固定化する。この固定組織をPBS中で5分間再水和し、そしてキットで提供されるTdT、反応緩衝液およびFITC-BrdUの混合液と共にインキュベーションする。組織をDNA標識混合液と共に一晩中室温(22~24℃)にてインキュベーションし、洗浄し、そしてヨウ化プロピジウム(PI)/RNaseで30分間対比染色し、洗浄し、退色防止剤(permafluor)で処理し、さらにカバーガラスで覆う。FITC-BrdU取り込みは、以下に記載されるように、レーザースキャニングサイトメーター(laser scanning cytometer)(LSC)(CompuCyte, Cambridge, MA)を使用して定量化される。

30

40

#### 【0146】

マウスの凍結組織切片の免疫細胞化学的標識化については、組織はアポトーシスアッセイについて上述したように固定化される(Greenら、1995; Greenら、2001)。この固定組織を一次抗体(抗-IRP-1、抗-IRP-2、抗-フェリチン、抗-トランスフェリン/トランスフェリンレセプター、-アミロイドユビキチンおよびヘモシデリン)で染色する。一次抗体/抗血清とのインキュベーションは16時間4℃であり、その後0.05% Tween-20含有PBS(PBST)中で洗浄する。蛍光分子と直接的に複合化しない抗体は、4時間の最小インキュベーション時間の間25℃にて、alex-488、alex-594、Cy-2、Cy-5抗-マウスまたはウサギIgG抗体で二次標識される。この2次抗体インキュベーションの完了の直前に、DAPI(1g/ml)またはヨウ化プロピジウム(PI、5g/ml)が、二重標識および/または分析の最終点としての共焦点顕微鏡に依存して、10分間添加される。PBST中で洗浄することによって過剰な二次抗体および核対比染色剤を除去し、そしてその組織を退色防止剤(permafluor)およびカバーガラスで保護し、そして定量的

50

分析（下記のような L S C および共焦点顕微鏡）および撮影の前に暗所で平らに乾燥される。非 - 特異的蛍光は、コントロール切片を非 - 免疫血清および二次抗体、もしくは二次抗体単独と共にインキュベーションすることによって、測定される。

#### 【0147】

マウス組織における特定のタンパク質（I R P - 2を含む）の定量化のために、蛍光 - 標識マウス組織についてレーザースキャニングサイトメトリック（L S C）が行われる。L S Cは、O l y m p u s B X 5 0 ベースを有し、そして6色分析のためのUVレーザー、ヘリウム - ネオンおよびアルゴンイオンを用いて設定される。4つのセンサーが存在し、スキャンに沿ったわずかに0.5 - マイクロメートルの空間的間隔に対応して、625, 000 Hzで同時にデジタル化される。蛍光エネルギーは、対物レンズ（o b j e c t i v e）によって集められ、C C Dカメラに細胞を画像化させるために、部分的に銀メッキされたミラーによって反射され、そしてスキャンレンズを通してスキャニングミラーへと導かれる。二色性ミラーおよび光学干渉フィルターが4本の光電子増倍管（各々が特定の範囲の蛍光波長を検出し得る）によって支えられる。蛍光測定値およびx、y座標はデジタルに記録され、そしてコンピューターベース中にF C Sファイルとして蓄積される。分析される組織は、標識核によって輪郭を描かれる。様々なゲーティングパラメーター（g a t t i n g p a r a m e t e r s）が選択され得るが、シグナル強度対細胞サイズ、細胞数（面積、周長、カウントなど）に関する情報を集めるものを含む。プロトコール設定およびディスプレイパラメーターは、コントロール陽性および陰性サンプルを使用して最適化され、その最適化プロトコールおよびディスプレイファイルは蓄積され、そして複製切片（r e p l i c a t e s e c t i o n s）をスキャンする際に利用される。

#### 【0148】

L S Cによって定量化される特定のタンパク質の局在については、共焦点顕微鏡法がマウス組織において行われる。多くのタンパク質は、それらの機能的性質と一致する個別の位置を有し、それゆえ共焦点顕微鏡によって、特定のタンパク質の細胞 / 亜細胞性局在によってよりよい理解が得られる（A l t u r aら、2001）。蛍光標識組織切片は、O l y m p u s I X - 7 0 ベース、B i o R a d - 1 0 2 4 共焦点顕微鏡を使用して3次元に画像化される。切片は、一般的な分布については低倍率（4 - 20x）（0.5 m z - ステップ）、また上記に列挙されるタンパク質の細胞 / 亜細胞位置を得るためには高倍率（40 - 100x）で捕らえられる。

#### 【0149】

マウス組織の鉄定量化については、鉄分布がプルシアンブルー染色法（第二鉄）によって、また総鉄が原子分光法によって、評価される。プルシアンブルー染色は、フェロシアン化カリウム（2.5%）とH C L 酸（2.5%）との室温にて20分間の混合を伴う標準的な方法（M o o s & M o l l g a r d, 1993）の感度変化を用いて、パラフィン包埋切片において行われ、過酸化水素を用いてリンスされ、そして細胞核はP Iを用いて対比染色される。

#### 【0150】

M R 画像データの統計的分析については、両側性の目的の領域（R O I）の左右比較が、一元配置（o n e w a y）A N O V A（ $p < 0.05$ ）を使用して各動物に対して行われるであろう。次いで、両側スチューデントt検定（t w o - t a i l e d s t u d e n t ' s t t e s t）（ $p < 0.05$ で有意であり、 $p < 0.01$ で非常に有意である）が行われ、コントロール値と各時点での実験値とが比較されるであろう。

#### 【0151】

M R 画像データから相対的鉄含有率を抽出するために、本発明は高解像度3Dグラディエントエコーシーケンスを使用する画像化方法に関する。研究されるほとんどの磁化率特性は、解像度が対象物の1~2倍サイズのファクターである場合、最も良く画像化される。この理由のために、ヒト脳において以下のパラメーター：T R = 67 m s、T E = 40 m s、 $0.5 \times 1.0 \times 2.0 \text{ mm}^3$ の解像度（5分のスキャン時間を伴う）が使用される。300~500ミクロンのオーダーの細静脈の様な小構造および脳幹神経節中の1 mm

<sup>3</sup> より小さいサイズの小さい鉄沈着が、それらのシグナル消去特性およびそれらの画像中での相効果ゆえに、画像に視覚化される。微小 - ボクセル効果に対するこの鋭い感度は、S W I を非常に強力にする。前記のように、40 分間のスキャンの間、 $0.25 \times 0.25 \times 0.25 \text{ mm}^3$  の解像度がマウス脳において集められ得る。

#### 【0152】

本発明の別の実施形態において、ランダムな系について、ボクセルサイズはあまり重要ではなく、それゆえより迅速な画像化およびより良い S N R のためにより大きなボクセルが使用され得る。グラディエントエコーシーケンスが上述されたファントムにおいて試験され、相が鉄濃度の関数および解像度の関数として測定され、測定のスケール不変性が確実にされる。

10

#### 【0153】

灰白質と白質との間の現在の鉄濃度差異は 40 m s におけるおよそ 20 度（およそ 0.1 p p m に相当する）として明示されるので、ファントム、動物およびヒトにおける相のエラー分析が適用された。マグニチュードイメージにおける S N R がわずかに 15 : 1 であるならば、相の標準偏差は 0.06 ラジアン（4° または 0.002 p p m）またはおよそ 10 パーセントエラーである。そのとき、3 標準偏差（0.005 の p 値を伴う 0.006 p p m に相当する）より大きい磁化率差異を評価することが想像される。平均化することによるデータの改良は 2 つの方法で達成され得る。第 1 は、必要とされる解像度に依存して、より多くのデータが取得されるか、またはデータがフィルターされる。例えばより低い解像度でも十分である場合、S N R を高めるためにより低い解像度で実験を行うこと

20

#### 【0154】

ヒトの研究については、最初の 5 人の正常個体およびアルツハイマー患者にマッチする 5 人の高齢者に関する画像パラメーターのいくつかのセットが使用される。i n v i v o における感度を評価するための 40、80 および 120 m s のエコー時間が含まれる。ボクセルサイズの関数としての感度を研究するために、解像度は  $0.5 \times 0.5 \times 1.0 \text{ mm}^3$  から  $1 \times 1 \times 2 \text{ mm}^3$  まで変化し得る。高解像度の画像において、このデータは、各方向にある 2 つのファクターによって低解像度画像にフィルターされ、低解像度のデータと比較されるであろう。この方法の理由としては、ギブスリング（G i b b s r i n g i n g）が低解像度スキャンに比例して減少し、場不均質性の影響が減少し、そしてスケール不変性効果がチェックされ得るという事実が挙げられる。

30

#### 【0155】

絶対鉄含有率は、M R 画像データより抽出され得る。T 2 ' 測定値における直線的増加が鉄濃度増加として予測される。次のように定義されるマルチ - エコー、グラディエント / スピンエコーの組み合わせが使用される。80 m s の T E を有するスピンエコー構造が作製される。このエコー時間については、同じ極性の一連の 31 エコー（2.5 m s ごとに 1 エコー）が収集される。以下の理論（より詳細には、参考 x x、x y および x z を参照のこと）は、理論的に予測され、実験的に実証されている。球体のランダムセットについてのシグナル挙動（これは、球体形状の集塊として知られる鉄についての優れた近似である）とりわけ、私達が大きなボクセルを使用していると仮定すると）は、以下によって与えられる：

40

$$S(t) = (1 - ) \exp(-0.41(t)^2) \quad \text{ただし、} t < 1.5$$

および

50

$S(t) = (1 - ) \exp(-it) \exp(-R2' \text{abs}(t - t_s))$   
 ただし、 $t > 1.5$

ここで、

$$= 4 (M - M_0) / 3, R2' = 1.21, t_s = 1 / (1.21)$$

および  $= -0.16$ 。

短時間および長時間成分を測定することによって、各指数関数における議論について、それゆえ  $(M - M_0)$  ( $dw$ より抽出される) についておよび (いま が分かっているので  $R2'$  から抽出される) についての数的な概算が得られる。例えば、MRIにおける造影剤 ( $AMI_{225}$  のような) として使用される磁気粒子について、は値  $3.4 \times 10^{-7} / s$  を有する。  $= 2 \times 10^{-6}$  の体積フラクションを使用することによって、他の概算値と非常に良く一致する  $82.23 / s$  の  $R2'$  (数的シミュレーションから  $80 \sim 100 / s$  の範囲をとる) が生じる。磁化率が分かっている場合、 $R2'$  は体積フラクションの測定値として直接的に使用され得る。ppmのオーダーの非常に小さい磁化率 (反磁性または常磁性物質のような) については、はmsのオーダーである。例えば、0.4のヘマトクリット (haematocrit) および55%の酸素飽和度を有する静脈について、の値は約3msである。皮肉なことに、より小さい磁化率である程より長いであり、そしてスピンエコー前または後に  $t_s$  が  $3 \sim 30 ms$  にある場合、シグナルは、その体積含有率と同様にシグナル損失を生成する供給源の磁化率を見いだすために使用される。シグナル損失の原因となることが見出される成分 (フェリチンなど) の各々の磁化率が測定されるので、この特徴は使用されない。しかしながら、 $R2'$  に直接的に関係する相項 (phase term)  $-0.16$  について、数的概算がなされ得る。磁場変化の1つの供給源しか存在しない場合、この概算は新たな情報を加えない。しかしながら、非ヘム鉄が唯一の供給源ではなく、またヘム鉄が上記に記載される静脈メカニズムを介して貢献する場合、これら2つはもはや関係ないかもしれないし、またエコーについて測定される時間的な応答は放物線であるだろう。このことから、非ヘム鉄からヘムを抽出するために、2つのパラメーターモデルが使用され得る。最後に、これを明瞭に成し遂げるための手段として、局所的磁化率を既知方法において改変し、そしてこの実験を繰り返すために、造影剤が使用される。

【0156】

上記結果を、場における以前の測定値と関連させて、 $T1$ 、 $T2$ 、および分散強調画像と比較する。動物モデルの切片において記載されるマルチエコー、スピンエコーシーケンスは  $T1$  を測定する。3D可変角方法 (3D variable angle method) および慣用的な2D多重IRシーケンスが使用され、 $T1$  値が概算される。

【0157】

次の4つの測定値のそれぞれについて完全なエラー分析が行われる: 相、 $R2'$ 、 $R2$  および  $R1$ 。この方法の間の矛盾が留意される。 $R1$  および  $R2$  方法について鉄との相関関係を壊すが相または  $R2'$  に影響しない多くの場合において、シグナル回復が起こり得る。

【0158】

全ての直線的相効果を取り除くための別の簡潔な方法は、二重エコー方法を使用することである。第一エコーからの相は、バックグランド相効果から予測される相の単純な直線的依存性に基づいて、第二エコーからの相を予測するために使用される。第一エコーの相 ( $BTE1$ ) に  $TE2 / TE1$  が掛けられて、 $BTE2$  が予測され、そしてその予測される相が第二エコーのものから引き算される (通常、複雑な除法によって達成される) 場合、補正画像の予測される相はゼロであるだろう。これは、相効果が単純に加法的でない2つのコンパートメントモデルに関係する任意の非-線形効果を排除し、さらにピクセル効果内の小さい領域の分離を可能にする。

【0159】

フェリチンの磁化率およびその赤核から得られる  $1450 nmol / gm$  の濃度についての既知の概算値を用いてヘムおよび非ヘム供給源から予測される相は、ヘム成分を定量化

するためのマルチ - エコー空間技術 ( multi - echo spatial technique ) を使用して推測される。ヘム鉄は、遊離鉄またはフェリチン中の鉄に対してではなく、血液に対する振動効果として現れる。この技術は、静脈血から生じる部分体積効果に敏感であり、且つ脳実質中の鉄の様な分布によって生じる影響と区別されるべきである。血液ナリング法 ( blood nulling method ) を使用して同様のシーケンスが行われる。ヘム鉄 ( 存在するならば ) 対遊離鉄またはフェリチン中に結合される鉄から生じる相挙動の量が定量化される。血液の影響は、血液の磁化率を真似るように既知量の造影剤 ( 慣用的な試薬は  $1^{\circ} / \text{mM} / \text{ms}$  の相効果を有する ) を使用することによって決定され得る。血液の影響を二倍することによって、血液そのものの相に及ぼす影響が推測される。解像度およびスケール依存性の問題に取り組むために、ヒトにおいて  $0.5 \sim 2 \text{ mm}$  および動物において  $0.25 \sim 1 \text{ mm}$  の範囲にある解像度にて実験が実施され、測定に及ぼすボクセルサイズの影響が存在するか否かが決定される。実質におけるまたは臨界時間  $t_s$  ( critical time ) における画像の相に対する変化は血液の寄与の指標である。

10

20

30

40

50

#### 【 0 1 6 0 】

相挙動および相フィルターのバックグラウンド材料を取り除く能力の研究が行われ得る。使用されるフィルターはハイパスフィルター ( high - pass filter ) であるので、DC情報の損失が生じる。これが磁化率の定量化に重要である ( 組織間の相違はあまり影響されない ) ので、DCレベル相を抽出する能力が試験され、そしてもともとの未フィルターデータと比較される。相の絶対測定値 ( 単なる相の差異ではなく ) を確実にするために、既知磁化率の基準マーカーが使用される。動物およびヒトの両方の画像化が実施される。

#### 【 0 1 6 1 】

本発明において、患者をモニターするためにMR画像化が使用される。MR画像化は、ペーター - アミロイドプラークの初期形成ならびにプラークからおよび血管変化からの後期におけるADおよび変性作用における結合鉄含有率に対して敏感であり、また脳鉄を定量するための方法を提供する。

#### 【 0 1 6 2 】

本発明の別の局面は、ADの早期介入および / または潜在的予防の方法に関する。ADの危険性を有する被験体は、この障害の攻撃的且つ破壊的な発症の前の数ヶ月 ~ 数年間に、実行機能および記憶を含む軽度認識障害を示すので、ADに対する診断的正確性を高める特定の分析的神経心理学的研究を用いるAD症例の長期的追跡調査、および詳細な認識試験が有用であると判明している。

#### 【 0 1 6 3 】

軽度認識障害 ( MCI ) ( 閾値下の痴呆の障害 ) がADに関連づけられると示されたので、本発明の好ましい実施形態は、MCI患者の標的集団に関する。この診断を受ける被験体は、標準的神経心理学的試験に基づく正常者に対する参照標準より下の  $1.0 \sim 1.5$  標準偏差を行い、そして標準的な試験によっては痴呆ではない。高齢者におけるMCIの早期検出についてのガイドラインおよび推奨実施法が最近発行された ( J o l l e s ら、Drugs Aging, 7 ( 6 ) : 459 - 79 ( 1995 ) )。好ましくは、本発明は、軽度認識障害 ( MCI ) の異なる症例の間を区別する方法に関する。さらに好ましくは、本発明は、静止状態に留まるMCIの症例を痴呆に急速に進行するMCIのこれらの症例から同定することを包含する。さらに、本発明は、痴呆症候群と外科的に処置され得るこれらの障害との間の区別する方法を包含する。例えば、MCIとシャントング術 ( shunting procedure ) によって緩和され得る正常圧水頭症 ( normal pressure hydrocephalus ) との間を区別するための方法が開発される。さらに、前頭側頭骨萎縮症とADからの多発脳梗塞性痴呆障害との間を区別するための方法が開発される。本発明の別の好ましい実施形態としては、焦点の認識方法および情報からのデータをサポートするミニメンタルステート ( Mini - Mental State ) 検査、神経心理学的試験を含むスクリーニング手段を用いるMCI患

者における痴呆の経過の臨床的モニタリングが挙げられる。

#### 【0164】

別の好ましい実施形態は、脳障害と鉄代謝との間の相互関係に関する。好ましくは、MRI技術による脳鉄定量のレベルは、患者における痴呆の臨床的経過と相関する。さらに、IRP-2アッセイを介してモニターされる末梢血IRP-2のレベルは、患者における痴呆の臨床的経過と相関する。異常なレベルの脳鉄または末梢IRP-2を有する患者は、さらなる研究のための、ならびにAD介入および潜在的なAD予防のための主要な候補であると明示される。

#### 【0165】

様々な供給源からのMCIを有する100の個体が研究に参加される。50の個体は最初の年に参加され、そして50の個体は二番目の年に参加される。1ヶ月あたり6~8人の新たなMCI患者を出会わせる紹介サービスが患者の主な提供元であるだろう。患者の二次的な提供元としては、ラジオおよびテレビジョンで通知および公共サービスメッセージを送るであろう地方の神経学者および心理学者が挙げられる。

#### 【0166】

電話での接触および直接的な紹介に続いて、被験体は、障害のレベルを評価するための精神測定学的研究を含むように広範囲な身体的および神経学的検査を受ける。これらのスクリーニング研究は、the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurologyによって記載される通りである。

#### 【0167】

エントリープロセスは、研究コーディネーターとの電話面接または直接的な紹介からなる。最初の訪問は、痴呆症状に関するメールでのアンケートに基づく選択の後の面接である。

#### 【0168】

クオリティスタンダード小委員会(Quality Standards Subcommittee)のガイドラインに従って、被験体の選択が行われる。この研究への参加のための基準としては、以下のことが挙げられる：

- 1) 年齢>50歳
- 2) 7学年以上の教育
- 3) 以下の主な神経学的障害の病歴をもたないこと：脳卒中、腫瘍、外傷、内分泌障害、薬物乱用、または精神医学的障害。

#### 【0169】

- 4) 神経破壊薬物維持の経歴をもたないこと
- 5) ミニメンタルステート検査 10のスコア
- 6) インフォームドコンセントを行うことができる
- 7) 体験を保存する人(家族の一員)がいること

各患者の評価は、2週間で完了され、また3回のセッションからなる。記録は記号化され、そして標準的な情報：精神測定学的スコア、血液分析結果、MRIデータは特別な記号形態で抽象化されるであろう。データは隔週でまとめられるだろう。ヒューマンサブジェクトリサーチコミッティーズオブローマリンダユニヴァーシティーメディカルセンターおよびNIHによって認可されるガイドラインに従って、全ての被験体にインフォームドコンセントを行う。

#### 【0170】

##### 実施例1

IRP-2ペプチドに特異的な抗体の調製

野生型および変異IRP-2ペプチドの酸化および還元型に特異的な抗体は、以下のように調製される。IRP-2のアミノ酸残基138-216のペプチドループ内にアラニンで置換された1つ以上のシステイン残基を有する7つのクローンが、分子生物学における慣用的な技術によって作製された。「C1A」クローンは、N末端に最も近い一番目のシ

10

20

30

40

50

ステインのアラニンとの置換を有する。(配列番号4)。「C2A」クローンは、N末端から二番目に近いシステインのアラニンとの置換を有する。(配列番号6)。「C3A」クローンは、N末端に三番目に近いシステインのアラニンとの置換を有する。(配列番号8)。「C12A」クローンは、N末端から一番目および二番目に近いシステインのアラニンとの置換を有する。(配列番号10)。「C23A」クローンは、N末端から二番目および三番目に近いシステインのアラニンとの置換を有する。(配列番号12)。「C13A」クローンは、N末端から一番目および三番目に近いシステインのアラニンとの置換を有する。(配列番号14)。「C123A」クローンは、N末端から一番目、二番目および三番目に近いシステインのアラニンとの置換を有する。(配列番号16)。野生型のペプチド配列もまた、E. coliにおいて組換え的に作製した。(配列番号2)。

10

#### 【0171】

組換えペプチドを単離すると直ぐに、それらを酸化または還元した。IRP-2の酸化は、0.1: g/lタンパク質の濃度で、20:1反応混合液(25mM Hepes-NaOH (pH 7.2)および40mM KCl)中において、50: M FeCl<sub>3</sub>および10mM DTTの存在下において、37℃にて15-30分間、行った。ペプチドの還元型は、そのペプチドをトリス-カルボキシエチル-ホスフィン(TCEP)(1mM)中において15-30分間37℃にてインキュベーションすることによって得られた。一旦酸化および還元型ペプチドを得ると、それらをKLHと結合させ、そしてマウスにおいて抗体を作製するために使用した。慣用的な方法を使用してハイブリドーマを作製し、そしてマウスを接種するために使用する特定のペプチドに特異的な抗体の産生のために、クローンをスクリーニングした。野生型ペプチドに対して作製された抗体は、ELISAおよびウェスタンブロットの両方において配列番号2のペプチドおよび全長IRP-2の両方を認識することが見出された。1:5000希釈で十分であることが見出された。この抗体のいくつかをスクリーニングするために、別の選択方法を使用した。IRP-2の酸化はシステイン残基のアミノマロン酸への変換に依存し得るので、アミノマロン酸を有するIRP-2ペプチドを合成した。このクローンをアミノマロン酸ペプチド、さらにまたネイティブなIRP-2ペプチドへの反応性についてスクリーニングした。ネイティブなペプチドではなくアミノマロン酸ペプチドに対して反応性であるクローンを選択した。この実施例において記載される教示を使用することによって、変異および野生型IRP-2タンパク質の両方に対する抗体を作製し得る。これらの抗体を本明細書中に記載する診断アッセイにおいて使用し、被験体の神経変性疾患に対する傾向を同定し得る。次の実施例は、野生型IRP-2に対して特異的な抗体を作製するために使用される類似方法を記載する。

20

30

#### 【0172】

##### 実施例2

##### IRP-2に対して特異的な抗体

この実施例では、IRP-2に対して特異的な抗体を作製およびスクリーニングするために使用する方法を提供する。抗体を作製するために、Balb/cマウスを、製造元のプロトコルに従いRIBIアジュバント(Corixa)中で63-残基(野生型)「ループペプチド」で免疫した。次いで、標準的なハイブリドーマ技術を使用して、マウス由来の脾臓細胞をSp2/0骨髓腫細胞に融合した。生じたハイブリドーマを、ループペプチドおよびその全体分子との反応性についてスクリーニングした。ELISA(ネイティブな分子)およびウェスタンブロット(変性分子)により、6つのクローンが陽性であった。これらのうち1つ(4G11)を、その生育特徴および強いアッセイ結果に基づいて、ラージスケール抗体産生のために選択した。

40

#### 【0173】

次いで、4G11と他の5つのクローンとの間で競合結合アッセイを行って、それらが同じまたは異なるエピトープを認識するか否かを決定した。唯一(14F7)だけ4G11の結合を有意に阻害せず、異なる部位で結合すると仮定された。このように、14F7および4G11-HRPは捕捉ELISA法(以下に記載する)のための基準となり、また

50



、生物学的サンプルにおけるIRP-2の検出のために使用され得る。このアッセイは、1: g/mLに低下するまで感度が良く、優れた直線性を示す。

#### 【0174】

捕捉アッセイを以下のように行った。未標識抗体をカルボネート緩衝液(pH 9.6)(Sigma #C-3041)中で通常1-10 µg/mLに希釈した。個々の抗体濃度は、10 µg/mLから始めて下方へ進めながら、経験的に決定される必要があるかも知れない。重要なことは、過密によって抗原結合を妨げないこと、そして依然として強いシグナルを与えるであろう最も低い濃度を選択することである。次いで、この抗体を1ウェル当たり約100: LでImmulon-1プレート(Dynex #3355)中にプレートし、テーブ(Falcon #3073)で覆い、そして4に overnight インキュベートした。 10

#### 【0175】

続いて、このプレートを室温まで加温し、そしてこのウェルをPBS(w/o tween)(Cellgro、#20-031-CV、1xに希釈される10x濃縮液)で3x洗浄した。次いで、このプレートを各ウェルに200: Lを添加し、逆さにすることによって空にし、そしてこのプロセスを合計3回繰り返すことにより、SuperBlock(Pierce #37515)でブロックした。次いで、ウェルをPBS-Tween(PBS+0.05% Tween-20, Sigma #P-6585)で3回洗浄した。希釈液(コントロール)、抗原、および標準(約100: 1)をウェルに添加した。使用した希釈液はキャリア(PBS-Tween中の10% SuperBlock) 20であった。ウェルをテーピングし、そして1時間室温にて反応を起こさせた。(プレートを振とうさせることによって、アッセイにおける感度が大きく増大するであろう)。続いて、ウェルをPBS-Tweenで3回洗浄した。

#### 【0176】

次に、キャリア中で希釈された約100: LのHRP-タグ化検出抗体を添加した。(市販の製品を使用する場合、製造元の推奨に従い、また自ら作製した抗体の適切な希釈は、経験的に決定した。)ウェルをテーピングし、そして1時間室温にて反応を起こさせた。(プレートを振とうさせることによって、アッセイにおける感度が大きく増大するであろう)。続いて、ウェルをPBS-Tweenで3x洗浄した。次いで約100 µL基質(Bio-Rad #172 1067)をウェルに添加した。約30分間覆わずに、反応 30を起こさせ、そして630 nm(参照490 nm)での吸光度にて読み取りを行った。アッセイのパラメーターは、約2.0のODがこのアッセイにおける最も濃縮された抗原サンプルについての約30分間のインキュベーションにおいて得られるというものであった。捕捉抗体、抗原、および検出抗体の適切な希釈度を捜す際、「チェッカーボード」アッセイを行うことが役に立つであろう。以下の実施例は、抗IRP-2抗体をビーズに結合するために使用した方法を記載する。

#### 【0177】

##### 実施例3

##### 支持体-結合型IRP-2抗体

この実施例は、フローサイトメトリーにおける使用のための支持体結合型IRP-2抗体を調製するために使用した方法を記載する。およそ、IRP-2に向けられた5ミリグラムの精製キャリア-フリー(他のタンパク質を含まない)マウスモノクローナル抗体をスルホ-SMCCを用いて修飾し、次いで2-イミノチオランで修飾された15 mgのr-フィコエリトリンに複合化させた。生じた複合体を、セファロースS-300-HRカラム上のサイズ排除クロマトグラフィーによって、遊離の未複合化r-フィコエリトリンおよび遊離未複合化モノクローナル抗体から分離した。この方法を完了させるのに2日間を要した。使用できる複合体の最終収率は、最初の抗体質量の50-95%であった(>85%の通常の予測収率)。首尾よく複合化をやぎ抗-マウスでコートされた7ミクロンビーズ上での複合体の捕捉によって確認し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。 40

## 【0178】

## 実施例 4

## 白血球の調製

単核細胞は、68% Percoll を使用する密度勾配分離法によってヘパリンで抗凝血された末梢血サンプルから調製される。簡単には、20 ml の末希釈全血液サンプルを 50 ml 遠心管中の 68% Percoll (25 ml) 上へ層状に置く。次いでこの血液を  $800 \times g$  で 20 分間遠心する。界面の細胞を回収し、そして遠心によってペレット形成させる。この細胞ペレットをボルテックスすることによって粉碎し、そして Vitalyse 赤血球溶解緩衝液 (25 ml) (BioErgonomics) を使用する溶解によって残りの赤血球を取り除いた。細胞を 25 ml の PBS で 1 回洗浄し、次いで  $1 \times 10^7$  単核細胞 / ml になるように再懸濁する。100 マイクロリットルの細胞 ( $1 \times 10^6$ ) を各標識手順のために使用する。

10

## 【0179】

炎症性サイトカイン発現の刺激のために、細胞を基本培地または ActiCyt - LPS 培地 (BioErgonomics, St. Paul, MN) のいずれかに  $1 \times 10^6$  細胞 / ml の濃度で再懸濁し、そして 5%  $CO_2$  の雰囲気において 37 °C にて 20 時間インキュベーションした。インキュベーションの最後の 4 時間の間、サイトカインの分泌を阻害し且つ細胞内染色を促進させるために、ゴルジ阻害剤 Brefeldin A ( $10 \text{ ng/ml}$ ) を培養物へ添加する。インキュベーション時間の後、細胞を回収し、そしてその培養上清をサイトカイン分泌アッセイのために保持する。細胞を細胞内サイトカインの検出のために保持する。

20

## 【0180】

細胞内 IRP - 2 タンパク質のレベル変化の検出のためのリンパ球の活性化またはアポトーシスの誘導を以下の方法で行う。100 万個の単核細胞を基本培地または ActiCyt - TC 培地 (BioErgonomics, St. Paul, MN) に再懸濁し、そして 5%  $CO_2$  の雰囲気において 37 °C にて 48 - 72 時間インキュベーションした。ActiCyt - TC 培地は抗 - CD3 抗体およびヒトサイトカインインターロイキン - 1 アルファ (IL - 1) およびインターロイキン - 2 (IL - 2) を含む。この培地は、特に、2 つのサイトカインに対するレセプターおよび T - 細胞抗原レセプターのイプシロン鎖を介して T - リンパ球を活性化する。

30

## 【0181】

## 実施例 5

## 蛍光色素 - 標識抗 - IRP - 2 抗体

## 1. 抗体の蛍光色素標識化

FITC を用いて抗体を標識するために、抗体を  $5 \text{ mg/ml}$  の濃度で  $100 \text{ mM}$   $KH_2CO_3$  緩衝液 (pH 9.0) 中へ入れ替える。FITC (Molecular Probes) (DMF 中で  $10 \text{ mg/ml}$ ) を 25 : 1 モル比で抗体に添加し、そして 1 時間室温にて暗所中でインキュベーションする。遊離 FITC を G - 25 Sephadex カラム上で抗体から分離する。2 - イミノチオランを用いてフィコエリスリンおよび Cy5 PE 複合体を産生し、抗体を修飾するための蛍光色素およびスルホ - SMC C を修飾する。次いで、この修飾タンパク質を暗所中で室温にて 1 時間共にインキュベーションする。遊離蛍光色素および抗体を、Sephacryl S - 300 - HR カラム (Sigma) 上の分離によって、蛍光色素 - 複合化抗体から分離する。タンパク質に対する蛍光色素の比における改変は、特定の抗体またはペプチド抗原についての蛍光シグナルを最適化するために必要不可欠であるかも知れない。

40

## 【0182】

## 2. 抗 - IRP - 2 抗体および蛍光色素標識抗 - IRP - 2 抗体のクオリティーコントロール

IRP - 2 ネイティブ、変異ペプチドおよびインタクトタンパク質に対して開発された抗体を、抗原 - ダウン ELISA (antigen - down ELISA) および Bio

50

Ergonomics, Inc. で開発されたマイクロ粒子 - ベース免疫蛍光アッセイの両方を用いて、特異性について試験する。ビオチン - 標識ネイティブおよび変異ペプチドまたはインタクトIRP - 2タンパク質を、高い特異性およびアビディティを伴ってビオチン - 標識分子へ結合する7  $\mu$ m直径アビジン - コートポリスチレン常磁性粒子に結合する。この新たに開発した抗体を、サンドウィッチアッセイによって、個々の様々なIRP - 2ペプチドでコートされる微粒子に対する特異性について試験する。抗原 - コート粒子に結合するIRP - 2特異的抗体を、続くフィコエリトリン - 標識ヤギ抗 - マウスIg抗体との反応によって検出する。サンプルをフローサイトメトリーによって分析する。陽性蛍光シグナルを生成する抗体は、ネイティブまたは変異ペプチドに対して潜在的に特異的であると考えられる。特異性は、細胞または抗原 - コート微粒子とのインキュベーションの前のこの細胞または抗原 - コート粒子の未標識抗体とのプレ - インキュベーションあるいは標識抗体の抗原とのプレ - インキュベーションにより抗 - IRP - 2抗体の特異的結合および蛍光を遮断することによって、確認される。

10

#### 【0183】

抗原 - コート微粒子を、既に選択されたIRP - 2特異的抗体の蛍光複合体のクオリティ - コントロールに使用する。最適なシグナル対ノイズ比を生み出すフィコエリトリンまたはCy5 - フィコエリトリン蛍光色素のいずれかを用いる抗 - IRP - 2抗体の最適な標識化を、抗原 - コート微粒子への結合および抗原 - 陽性および抗原 - 陰性細胞集団の両方の細胞内標識化に基づいて選択する。IRP - 2ペプチドの特定のエピトープまたは完全な分子に対する抗体の特異性のグループ分けを、未標識抗体を用いる蛍光色素 - 標識抗体の特定の遮断によって決定する。

20

#### 【0184】

##### 実施例6

MC I患者に由来する末梢血サンプルの分析

末梢血サンプルはMC I患者から得られるであろう。血液アッセイは最低限1年に2回行われる。

#### 【0185】

##### 1. APPの表面膜型の発現についてのアッセイ

APPの細胞表面膜型の相対的発現は、フローサイトメトリー分析により研究被験体に対して測定される。簡単には、APP (Boehringer Mannheim) のn - 末端に特異的なモノクローナル抗体22C11 (30分間) およびフィコエリトリン - 複合体化CD14を用いて、単離された単核細胞を染色する。抗体とのインキュベーション後、細胞をPBSで1回洗浄し、未結合抗体を除去し、次いで細胞をフローサイトメトリーによって分析する。

30

#### 【0186】

##### 2. 機能的細胞表面トランスフェリンレセプターの発現についてのアッセイ

試験被験体由来する細胞上の機能的トランスフェリンレセプターの相対的発現をフローサイトメトリー分析によって測定する。簡単には、単離単核細胞を100 ngのフィコエリトリン - 複合化ヒトトランスフェリン (BioE Inc.) で15分間染色し、そして未結合複合体を取り除くためにPBSで1回洗浄し、その後フローサイトメトリー分析を行う。機能的レセプター (すなわち、実際にトランスフェリンを結合し得るレセプター) の発現は、細胞の蛍光強度に直接的に比例する。

40

#### 【0187】

##### 3. 白血球を循環させることによる前炎症サイトカインの発現についてのアッセイ

単核細胞 ( $1 \times 10^6$  / ml) を細菌性リポポリサッカリド (LPS) の存在または非存在下において20時間インキュベーションし、前炎症サイトカイン類であるインターロイキン - 1アルファ (IL - 1)、インターロイキン - 6 (IL - 6)、および腫瘍壊死因子 - アルファ (TNF - ) の基礎および刺激産生を測定する。サイトカイン産生細胞の同定を細胞内サイトカインの分析によるフローサイトメトリーによって行う。簡単には、IRP - 2タンパク質の同定について記載されるように、細胞を固定化および透過化す

50

る。細胞を I L - 1 、 I L - 6 および T N F - に対して特異的な P E - または C y 5 P E - 標識抗体で標識する。20時間のインキュベーションの間に培養培地中に分泌されるサイトカインの量を、フローサイトメトリー - ベースの定量的免疫蛍光アッセイ ( I m m u n o F l o w a n d M u l t i F l o w , B l o E r g o n o m i c s , I n c . , S t P a u l , M N ) によって測定する。

【0188】

4. 活性型単核細胞におけるアポトーシスまたは壊死の検出のためのアッセイ 簡単には、A c t i C y t e - T C によって活性化される100万の単核細胞を、P B S を用いて洗浄し、ホスファチジルセリン結合タンパク質 A n n e x i n - V - F I T C ( 2 0 0 n g , C a l t a g , S o u t h S a n F r a n c i s c o , C A ) および D N A - イ 10  
ンターカレーティング色素ヨウ化プロピジウム ( 4 μ g ) を用いて染色した。A n n e x i n - V 単独または A n n e x i n V およびヨウ化プロピジウムに対して陽性である細胞は、それぞれ初期または後期 - 段階のアポトーシス性であると考えられ、一方ヨウ化プロピジウム単独に対して陽性である細胞は壊死性であると考えられる。

【0189】

5. 細胞内 I R P - 2 ループペプチドの発現および I R P - 2 発現細胞の同定についてのアッセイ

F I C T 、 P E および C y 5 P E - 複合化抗 - I R P - 2 モノクローナル抗体を使用するフローサイトメトリー分析によって細胞内 I R P - 2 ループペプチドの発現を測定し、ネ 20  
イティブな I R P - 2 タンパク質を発現する細胞を同定する。実験は、I R P - 2 鉄分解ドメイン多型を探索するために計画された。洗浄細胞 ( P B S 1 0 0 μ l 中  $1 \times 10^6$  ) を、細胞内 I R P - 2 タンパク質に対して向けられた蛍光標識抗体の特異的結合による30分間の発現の間、1 m l の1%ホルムアルデヒド中でインキュベーションすることによって、固定化する。陽性蛍光および特定の抗 - I R P - 2 抗体に対する特異性の同定を、抗原または未標識抗体とのプレインキュベーションによって特異的に競合され得る蛍光強度におけるシフトによって、測定する。特定の抗 - C D 抗体に対して陽性の細胞を、同様に標識されたアイソタイプコントロール抗体またはその蛍光染色が未標識抗体によって特異的に阻害される細胞に対する比較によって、決定する。

【0190】

6. フローサイトメトリーデータと患者の臨床状態との相関関係 30

各患者に対するデータシートを有する個別のファイリングシステムにおいて、フローサイトメトリーデータを患者の臨床状態と相関させる。I R P - 2 「ループペプチド」分解スクリーンの結果を、M C I 被験体群において分散分析 ( A N O V A ) を用いて分析する。2つの集団コホート ( A D および高齢者のコントロール ) における変異 I R P - 2 タンパク質を比較するデータをさらに試験し得る。本発明は実施形態および実施例に対する参照を用いて記載されたが、種々の改変が本発明の精神から外れることなく行われ得ることが理解されるべきである。従って、本発明は以上の請求項によってのみ制限される。本明細書中に記載される全ての参照は、本明細書中で参考として明白に援用される。

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/12284 A2**

- (51) International Patent Classification: **C07K 14/00** Tracey, A.; 7009 Tilden Lane, North Bethesda, MD 20852 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/24747
- (22) International Filing Date: 6 August 2001 (06.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/222,863 4 August 2000 (04.08.2000) US
- (71) Applicants: LOMA LINDA UNIVERSITY MEDICAL CENTER [US/US]; Coleman Pavilion, 11176 Campus Street, Suite #A1116, Loma Linda, CA 92350 (US); THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, as represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES [US/US]; National Institutes of Health, Office of Technology Transfer, Suite 325, 6011 Executive Boulevard, Rockville, MD 20852-3804 (US).
- (72) Inventors: KIRSCH, Wolff, M.; 1360 Prospect Drive, Redlands, CA 92373 (US). LENNART, Anton; 11872 Cardinal Court, Loma Linda, CA 92354 (US). KELLN, Wayne, J.; 25232 Lawton Avenue, Loma Linda, CA 92354 (US). KANG, Dae-Kyung; 257 Congressional Lane #613, Rockville, MD 20852 (US). LEVINE, Rodney, L.; 1502 Auburn Avenue, Rockville, MD 20850 (US). ROUALT,
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE (utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EC, EE, EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/12284 A2

(54) Title: IRON REGULATING PROTEIN-2 (IRP-2) AS A DIAGNOSTIC FOR NEURODEGENERATIVE DISEASE

(57) Abstract: The present invention relates to the discovery of markers for neurodegenerative disease. More particularly, it was discovered that forms of IRP-2 protein that are unable to undergo oxidation at critical cysteine residues are diagnostic for neurodegenerative disease including, but not limited to Alzheimer's Disease (AD). Embodiments include nucleic acids that encode mutant IRP-2 proteins and fragments thereof, mutant IRP-2 proteins and fragments thereof, antibodies directed to epitopes present on mutant IRP-2 proteins and fragments thereof, methods of making these nucleic acids and polypeptides, as well as, approaches to diagnose neurodegenerative disease in animals, such as humans at risk of contracting AD or mild cognitive impairment syndrome (MCI). The level or distribution of iron in a human brain, as determined by magnetic resonance imaging (MRI), can be used to diagnose AD and/or MCI.

WO 02/12284

PCT/US01/24747

## IRON REGULATING PROTEIN-2 (IRP-2) AS A DIAGNOSTIC FOR NEURODEGENERATIVE DISEASE

## FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to the discovery of markers for neurodegenerative disease. More particularly, it was discovered that forms of iron regulating protein 2 (IRP-2) are unable to undergo oxidation at critical cysteine residues and are diagnostic for neurodegenerative disease including, but not limited to, Alzheimer's disease.

## BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Neurodegenerative disease plagues several million people world-wide. Alzheimer's disease (AD), for example, is the fourth most common cause of death in the United States after heart disease, cancer, and stroke. It presently afflicts more than 4 million people in the United States alone and this number is expected to double during the next 40 years as the population ages. Apart from advanced age and Downs syndrome, the only consistent risk factor for the development of neurodegenerative disease has been the presence of a positive family history. Currently, investigators are performing genetic linkage analysis to identify diseased genes that contribute to neurodegenerative disease, however, the understanding of the biochemical mechanisms that underly these maladies remains in its infancy.

20 Recently, however, there has been an increase in suspicion that a disturbance in brain iron regulation contributes to some forms of neurodegenerative disease, for example, AD (Gerlach et al., *J. Neurochem.* 63:793-807 (1994)). In the brain, iron metabolism is tightly controlled. An excess of iron results in toxicity and too little impairs metabolism. All tissues regulate iron uptake through the action of iron regulatory protein 1 (IRP-1) and iron regulatory protein 2 (IRP-2). Recent findings reveal that that these iron regulatory proteins, particularly IRP-2, are involved in the impaired iron homeostasis that is observed in patients suffering from Alzheimer's disease. (Smith et al., *Brain Research*, 788:232-236 (1998)).

25 In iron deficient cells, for example, an increase in IRP-2 levels is observed. As a result of this increase, IRP-2 binds to the 3'prime untranslated region of the mRNA for transferrin receptor, which is a protein that facilitates iron uptake. Additionally, IRP-2 prevents binding to the 5' cap structure of HnRNA encoding ferritin blocking binding and subsequent translation. In essence, iron uptake is facilitated by the presence of high levels of IRP-2. On the other hand, if cells are provided an excess of iron, IRP-2 is rapidly degraded and iron uptake is immediately reduced. Thus, the body achieves iron homeostasis by regulating the degradation of IRP-2. (Van Buskirk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:722-725 (1984)). A greater understanding of the induction of IRP-2 degradation is needed.

30 Though there are a number of reports in the literature on the quantitation of brain iron by MRI (Scheffler et al., *Magn Reson Med.*, 42(5):829-36 (1999); Vymazal et al., *J Neurol Sci.*, 134 Suppl:19-26 (1995); Quast et al., *Magn Reson Imaging*, 11(4):465-71 (1993)), no universally accepted methods or standards and no calibrated or verified data on humans exist. Serial, longitudinal studies looking for differences in rates of change for example, of temporal lobe and hippocampal volume, have proven to be

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 2 -

more powerful diagnostic aids than isolated measurements. Temporal lobe atrophy has been followed serially in AD patients with MR imaging techniques. The ability to assess quantitatively and sequentially regional brain iron provides potential utility in both diagnosis and monitoring of prospective treatments of individuals with neurodegenerative disorders.

5 Iron has numerous effects on MR images in its paramagnetic form. Effects include signal changes in magnitude and phase images in T2\* weighted gradient echo images, signal changes in T2 weighted and diffusion weighted spin echo images, and signal increases in T1 weighted images. In gray matter where iron content is high (such as in the central sulcus), iron behaves as a T1 reducing contrast agent.

10 One major source of brain iron is the ferric form of ferritin which plays a major role in storage and utilization of iron in the brain. Each ferritin molecule consists of different ratios of H (heavy) and L (light) chain subunits which are coded on different chromosomes, and play different roles in the function of the ferritin molecule. The H-rich ferritin is efficient at iron sequestration and is predominant in organs with high iron utilization and little iron storage while L-rich ferritin is efficient at iron nucleation and is associated with iron storage. In the brain, various cell types contain ferritin isoforms that are consistent with their functional roles. 15 Ferritin has unique magnetic properties and is believed to be the major source of iron-induced changes in MR tissue relaxation times. The amount of ferritin is ten times the amount of transferrin in the brain with each ferritin molecule having the ability to sequester up to 4500 iron atoms. Ferritin is stored in oligodendrocytes, astrocytes and myelin in microglia. Macrophages can convert ferritin to hemosiderin, another potent paramagnetic substance that generates signal changes in T2\* weighted MRI images. Despite this general knowledge, the MRI properties of ferritin are not well understood. The expected field dependence of R2 is the square of the static field. To the contrary, all evidence points to a linear change in R2 with field strength. Further, relaxation rates are generally found to be too high to be explained by simple paramagnetism. A recent paper quotes relaxivities of ferritin for R1 of 2.19 +/- 0.05 /s/mg Fe/g, a value consistent with other measurements (Gossuin et al., *Magn Reson Med*, 43(2):237-43 (2000)).

25 The second major source of brain iron is free iron. Other sources of trapped iron exist but their concentrations are small. In agreement with the phase measurements, R2 or R2' data and other measures of brain iron, the basal ganglia contain more stainable iron than the cerebral hemispheres and white matter. From assays of brain iron post-mortem, iron levels are 2 µg/gm in the red nucleus for elderly individuals while normal levels in the globus pallidus are about 0.25 µg/gm tissue. Other observations include increased iron stores in the hippocampus in Alzheimer's disease and Parkinson's disease, increased ferritin in grey matter upon aging, and unchanged levels of astrocyte iron.

30 High field results on animals (Fenzi et al., *J Magn Reson Imaging*, 13(3):392-6 (2001)) and humans (Bonkovsky et al., *Radiology*, 212(1):227-34 (1999); Bartzokis et al., *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 46(4):821-33 (2000)) have attempted to quantify brain iron. Although the trend clearly demonstrates an increase in R2 as iron content increases, the predictability of the results is difficult. For example, Fenzi shows that the slope for R2 is 10 to 30/s/(mg/gm Fe) on a phantom with an R2 of 40/s when there is no iron. However, *in vivo*, a single T2 of 150/s can correspond to a range of 1.5 to 3.5 mg Fe/gm wet weight, far too broad to be of clinical

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 3 -

value. Similarly, Bonkovsky's data show that a single signal intensity measurement corresponds to a range of 2/mg/gm dry liver for low concentrations and 5/mg/gm dry liver for concentrations above 1/mg/g dry liver.

Orlidge and his group (Mizkeil et al., *Magn Reson Imaging*, 15(10):1113-9 (1997) demonstrated that key information lies in R2' not R2. A problem with R2 results because of other effects that can change T2 and confound information about local iron. Signal for long echoes despite the local increase in iron in the substantia nigra are anomalously recovered with R2' continuing to increase with an increase in iron content. A method was developed by Orlidge et al. to measure R2' despite the presence of background field variations that dephase the signal and otherwise yield a falsely high value for R2'. The local field in the slice select direction was compensated by repeating the scan multiple times using different slice select gradients.

Gelman et al. measured both R2 and R2' effects and found (*Radiology*, 213(1):135-40 (1999) that the slope of R2 is 60/s/mg wet wt with an intercept 12.7 or T2 of about 80ms, the slope of R2' is 50/s/mg wet wt with an intercept 2.7 (one might postulate that this non-zero intercept may represent the heme iron contribution) and as an example, the R2' of globus pallidus is 12/sec. In fact, a number of papers have demonstrated the T2 and T2\* effects of iron in the basal ganglia and liver. Further, diffusion mechanisms have been used to describe the signal loss with iron. More recently, theories involving spin dephasing in the static or slow diffusion regime and in the fast diffusion regime. This unique feature has been considered when evaluating parallel fibres (Hajnal et al., *J Comput Assist Tomogr.*, 16(4):506-13 (1992)) and to measure oxygen content in the brain (An and Lin, *J Cereb Blood Flow Metab.*, 20(8):1225-36 (2000)).

T2\* measurements and R2' quantification are now considered optimum for brain iron measurements. Gillet et al. (*J Neurol Sci.*, 168(1):21-7 (1999)) uses a 3D gradient echo structure with a TE = 9ms at a field strength of 11.7T, almost exactly the equivalent of what we use at 1.5T for the best phase contrast images. Iron is seen in basal forebrain cholinergic structures such as the basal of Meynert in a well established mouse model that has the neuropathological hallmarks, including senile plaques and neurofibrillary tangles, of AD, while a high iron content is observed in the globus pallidus in AD.

Forgetful individuals most likely to develop AD have a condition known as mild cognitive disorder or mild cognitive impairment syndrome (MCI) previous to their development of dementia. MCI is distinguished by memory impairment that is abnormal for the age and educational level of the individual. Although not all individuals with MCI develop AD, MCI can serve as a potential marker for early onset of AD. Some researchers have suggested that MCI be regarded as incipient AD and that individuals diagnosed with MCI would benefit from drug therapy (Sramek et al., *Ann Pharmacother*, 34(10):1179-88 (2000)). Thus, MCI screening may be beneficial in terms of early AD intervention and/or AD prevention.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

In one aspect, the invention provides a purified or isolated nucleic acid comprising a sequence that encodes a peptide loop corresponding to amino acid residues 136-216 of wild-type IRP-2 from humans, wherein said sequence comprises a mutation in said peptide loop, wherein said mutation interferes with the ability of a cysteine residue present in said peptide loop to undergo oxidation. In one embodiment, the nucleic



WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 4 -

acid sequence can comprise at least one of SEQ. ID Nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15. Preferably, the nucleic acid sequence encodes a peptide comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ. ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16.

- In another preferred embodiment, the purified or isolated polypeptide comprises a peptide loop
- 5 corresponding to amino acid residues 136-216 of wild-type IRP-2 from humans, wherein said sequence comprises a mutation in said peptide loop, wherein said mutation interferes with the ability of a cysteine residue present in said peptide loop to undergo oxidation. The IRP-2 protein can comprise a sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16. Preferably, the IRP-2 protein is selected from the group consisting of SEQ. ID. Nos. SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16. More preferably,
- 10 the invention concerns the use of such a mutant polypeptide in a method of making a probe for the diagnosis of a neurodegenerative disease and involves generating an antibody that binds to an epitope present on said mutant polypeptide, wherein said antibody does not cross react with a wild-type IRP-2 protein or fragment thereof. The mutant can comprise a substitution or a deletion of a cysteine residue. Further, the generating step can comprise culturing cells which produce said antibody.
- 15 In another embodiment, the invention concerns a method of identifying a subject in need of treatment or prevention of a neurodegenerative disease comprising: obtaining a biological sample from said subject having polynucleotides or protein; providing a probe, said probe being selected from the group consisting of a probe that interacts with a wild type or mutant IRP-2 protein and a probe that interacts with a polynucleotide encoding a wild type or mutant IRP-2 protein; contacting the biological sample with the probe under conditions
- 20 that allow the probe to interact with the polynucleotide or protein in the biological sample; detecting the amount of probe that interacts with the polynucleotide or protein in the biological sample; and identifying the subject as a subject in need of treatment or prevention of neurodegenerative disease by determining the presence or absence of the probe with the polynucleotide or protein in the biological sample. Preferably, the method comprises determining whether the probe interacts with the polynucleotide or protein in the biological
- 25 sample. More preferably, the probe is selected from the group consisting of a nucleic acid, a protein, and a peptidomimetic. Further, the detection of the amount of probe that interacts with the polynucleotide or protein comprises use of a technique selected from the group consisting of fluorescence-activated cell sorting (FACS), immunoprecipitation, Western blot, immunochromatography, antibody staining, and a hybridization assay. Further, the neurodegenerative disease is Alzheimer's disease.
- 30 In another preferred embodiment, the invention concerns an antibody capable of specifically binding to a protein comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16. Preferably, the antibody specifically binds to a polypeptide comprising at least 10 consecutive amino acids of said protein and said protein has a mutation of a cysteine residue. More preferably, the antibody is a monoclonal antibody.
- 35 In another preferred embodiment, the invention concerns a purified or isolated antibody capable of specifically binding a mutant IRP-2 protein but does not specifically bind wild-type IRP-2 protein, wherein said

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 5 -

mutant IRP-2 protein comprises a mutation in a peptide loop that corresponds to the amino acid sequence of SEQ. ID. No. 2.

In another aspect, the invention concerns a method of differentiating mild cognitive impairment syndrome (MCI) from other forms of dementia in a human patient, comprising conducting magnetic resonance imaging (MRI) on the patient to quantitate and/or monitor brain iron wherein abnormal levels or distribution of brain iron indicate the presence of MCI.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

One aspect of the invention relates to the discovery that mutations in the IRP-2 gene result in forms of IRP-2 proteins that resist degradation in the body and, thereby, perturb iron homeostasis. Some mutations occur within a peptide loop of IRP-2, wherein critical cysteine residues undergo an iron-dependent oxidation event that initiates the degradation process.

Embodiments include nucleic acids encoding mutant IRP-2 proteins, mutant IRP-2 proteins, and fragments of these molecules. Additionally, embodiments include nucleic acids that are complementary to nucleic acids encoding mutant IRP-2 proteins or fragments thereof and antibodies that bind mutant IRP-2 proteins or fragments thereof. Preferably, the complementary nucleic acids described herein specifically detect a nucleic acid encoding a mutant IRP-2 protein and differentiate nucleic acids encoding a mutant IRP-2 protein from nucleic acids encoding a wild-type IRP-2 protein. Similarly, the preferred antibodies described herein specifically detect a mutant IRP-2 protein and differentiate a mutant IRP-2 protein from a wild-type IRP-2 protein.

Several assays described herein are designed to detect the presence of mutations in a nucleic acid encoding an IRP-2 protein or in the IRP-2 protein itself or a fragment of these molecules. Accordingly, nucleic acid sequences that complement nucleic acids that encode wild type and/or mutant IRP-2 proteins or fragments thereof and antibodies that bind epitopes on wild type and/or mutant IRP-2 proteins are used as *ex vivo* markers for neurodegenerative disease, including but not limited to, Alzheimer's disease. Thus, the diagnostic embodiments described herein concern both nucleic acid-based and protein-based assays and kits that incorporate these assays, which detect nucleic acids that encode a wild-type and/or mutant IRP-2 protein or IRP-2 proteins in biological samples (e.g., samples having peripheral blood cells). Automated techniques for diagnostic determination, such as standard flow cytometric techniques and array technology, can be used with some of the embodiments described herein. Monoclonal and polyclonal antibodies that detect wild-type or mutant IRP-2 proteins can be used with flow cytometry, for example, to rapidly determine whether a patient has a predilection to contract a neurodegenerative disease, such as Alzheimer's disease.

Support-based assays, such as ELISA, immunochromatography, and immunostrip assays, can also be adapted to detect the presence or absence of wild-type and/or mutant IRP-2 proteins. In one embodiment, for example, probes that bind to nucleic acids encoding wild-type or mutant IRP-2 proteins or antibodies that bind to mutant or wild-type IRP-2 proteins are joined to a support and are used to screen biological samples and, thereby, provide a diagnosis of a neurodegenerative disease.

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 6 -

Additionally, the diagnosis of neurodegenerative disease, such as Alzheimer's disease, can be accomplished by using wild type or mutant IRP-2 proteins or fragments thereof joined to a support. Accordingly, immobilized IRP-2 proteins or a fragment thereof is contacted with a biological sample having circulating antibodies and the presence or absence of antibodies to the mutant or wild-type IRP-2 protein can be determined by using a secondary detection molecule (e.g., a labeled anti-IgG antibody). The presence of

antibody to mutant forms of IRP-2 indicates a predilection to contract a neurodegenerative disease.

It is contemplated that IRP-2 degradation and, thus the regulation of iron homeostasis, is initiated in healthy individuals by an iron-dependent oxidative modification that occurs at a peptide loop formed by amino acid residues 136-216 of IRP-2. This iron-dependent oxidation modifies three critical cysteine residues within this peptide loop and results in the production of aminomalonic acid. The conversion to aminomalonic acid sets the stage for ubiquitination, which signals proteasome degradation of IRP-2. In contrast, it is contemplated that individuals suffering from a neurodegenerative disease (e.g., Alzheimer's disease) have mutations in the IRP-2 gene that result in IRP-2 proteins that are unable to undergo oxidative modification or exhibit a reduced level of oxidative modification. Some individuals may also have a multi-faceted gradient of IRP-2 proteins, wherein some IRP-2 proteins are unable to undergo iron-dependent oxidation, some IRP-2 proteins undergo a moderate amount of iron-dependent oxidation and other IRP-2 proteins undergo normal levels of iron dependent oxidation. By monitoring the levels of mutant and wild-type IRP-2 proteins and/or the nucleic acids encoding these molecules, a prognosis of neurodegenerative disease can be made.

Embodiments include nucleic acids encoding mutant IRP-2 proteins that are resistant to degradation in the body, complements thereto, and fragments of these proteins having at least one mutation. Desirably, these nucleic acids encode proteins that have mutations within a peptide loop corresponding to amino acid residues 136-216 of the sequence of human wild type IRP-2. A 189 nucleotide long fragment encoding a region of the wild type IRP-2 peptide loop is provided in the sequence listing. (SEQ. ID. No. 1). The full -length cDNA sequence encoding human wild type IRP-2 is provided in SEQ. ID. No. 17 and can be found in Guo et al., *J. Biol. Chem.* 270 16529 (1995), herein expressly incorporated by reference in its entirety. Additionally, the full -length cDNA sequence encoding rat wild type IRP-2 is provided in SEQ. ID. No. 19 and can be found in Guo et al., *J. Biol. Chem.* 270 16529 (1995), herein expressly incorporated by reference in its entirety. When reference is made to wild type IRP-2 nucleic acids, depending of the context, it is meant to refer to the wild type IRP-2 molecules including those provided in SEQ. ID. Nos. 17 and/or 18 or that can be found in Guo et al., *J. Biol. Chem.* 270 16529 (1995), herein expressly incorporated by reference in its entirety.

Preferably, the nucleic acid embodiments have at least one mutation that results in an inability of a cysteine residue within the peptide loop corresponding to amino acid residues 136-216 of wild type human IRP-2 to undergo iron-dependent oxidation. This mutation may involve a substitution or deletion of a cysteine residue within this peptide loop or a mutation that perturbs the three-dimensional structure of the peptide loop so as to prevent iron-dependent oxidation. The sequences of several nucleic acids that encode a region of the peptide loop of a mutant IRP-2 protein are disclosed in SEQ. ID Nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15.

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 7 -

- Some nucleic acid embodiments are genomic DNA, RNA, and cDNA encoding a mutant IRP-2, a complement thereto or a fragment of these molecules that contain at least one mutation. Some embodiments comprise a plurality of mutations that result in multiple substitutions and/or deletions within this peptide loop (e.g., mutations that result in the substitution and/or deletion of more than one cysteine). Preferably, the nucleic acid
- 5       embodiments include the nucleotide sequences shown in the sequence listing (**SEQ. ID Nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15** and complements thereof and/or fragments thereof. Nucleic acid sequences encoding mutant IRP-2 from humans, mammals, and other organisms are also embodiments, as are methods for obtaining such sequences. The nucleic acid embodiments can be altered, mutated, or changed such that the alteration, mutation, or change results in a conservative amino acid replacement.
- 10       The polypeptide embodiments described herein concern mutant forms of IRP-2 that are resistant to degradation in the body and fragments of these proteins having at least one mutation. Desirably such polypeptides have a mutation in a peptide loop corresponding to amino acid residues 136-216 of human wild type IRP-2, which contributes to the stability of the molecule to degradation in the body (e.g., stability to proteosome degradation.) A 63 amino acid long peptide corresponding to a region of the wild type IRP-2 peptide loop is
- 15       provided in the sequence listing. (**SEQ. ID. No. 2**). The full-length amino acid sequence of human wild type IRP-2 is provided in **SEQ. ID. No. 18** and can be found in Guo et al., *J. Biol. Chem.* 270 16529 (1995), herein expressly incorporated by reference in its entirety. Additionally, the full-length amino acid sequence of rat wild type IRP-2 is provided in **SEQ. ID. No. 20** and can be found in Guo et al., *J. Biol. Chem.* 270 16529 (1995), herein expressly incorporated by reference in its entirety. When reference is made to wild type IRP-2 proteins,
- 20       depending of the context, it is meant to refer to the wild type IRP-2 proteins including those provided in **SEQ. ID. Nos. 17** and/or **18** or that can be found in Guo et al., *J. Biol. Chem.* 270 16529 (1995), herein expressly incorporated by reference in its entirety.
- Preferably, the polypeptide embodiments have at least one mutation that perturbs the iron-dependent oxidation of a cysteine residue within the peptide loop corresponding to amino acid residues 136-216 of human
- 25       wild type IRP-2. This mutation may involve the substitution or deletion of a cysteine residue within this region or a mutation that perturbs the three-dimensional structure of the peptide loop so as to effect iron dependent oxidation of IRP-2. Some embodiments comprise a plurality of mutations within this peptide loop (e.g., more than one cysteine is mutated). Several mutant IRP-2 peptides are provided in **SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16**.
- The polypeptide embodiments also include the partial or complete amino acid sequences shown in the
- 30       sequence listing (**SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16**) and functional equivalents to such molecules including, but not limited to, the polypeptides of **SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16** having non-conservative amino acid substitutions and peptidomimetics that resemble these molecules. Additional embodiments include methods of preparing the polypeptides described herein and molecules that bind these polypeptides. Embodiments also include, for example, polyclonal and monoclonal antibodies that recognize wild-
- 35       type and/or mutant IRP-2. Preferred antibodies bind to epitopes on mutant IRP-2 but not wild-type IRP-2 or vice versa so as to distinguish between these molecules. Novel approaches to manufacture the monoclonal and polyclonal antibodies described herein are provided.

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 8 -

- The diagnostic embodiments (including diagnostic kits) are designed to identify a predilection to neurodegenerative disease in organisms (e.g., insects, animals, mammals, and humans). Preferably, the diagnostic embodiments are employed to identify subjects at risk for Alzheimer's disease. Both nucleic acid and protein-based diagnostics are encompassed by aspects of this invention. That is, some diagnostic embodiments determine the predilection to neurodegenerative disease by detecting the presence or absence of a diagnostic nucleic acid or protein by using a probe that interacts said diagnostic nucleic acid or protein. The diagnostic nucleic acid can be, for example, a nucleic acid encoding a wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof. The diagnostic protein can be, for example, a wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof. The term "probe", depending on the context, can refer to a molecule that interacts with a diagnostic nucleic acid or diagnostic protein or fragment thereof. Examples of "probes" include nucleic acids that complement at least a fragment of a wild type or mutant IRP-2 nucleic acid sequence (e.g., human or rat IRP-2) and antibodies that interact with epitopes that are present on a wild type or mutant IRP-2 protein sequence (e.g., human or rat IRP-2). Preferred probes specifically interact with said wild type diagnostic nucleic acid or diagnostic protein but not said mutant diagnostic nucleic acid or diagnostic protein or vice versa.
- Some diagnostic embodiments, for example, concern support-bound assays that determine the ability of wild type or mutant IRP-2 or fragments thereof to interact with antibodies present in a biological sample. Desirably, the wild type or mutant IRP-2 or fragment thereof are disposed on the support in a multimeric fashion. Preferred embodiments comprise IRP-2 or a fragment thereof having a mutation in the peptide loop corresponding to amino acid residues 136-216 of wild type human IRP-2, which contributes to the stability of IRP-2. Most preferably, the IRP-2 or fragment thereof that is joined to the support to create the multimeric agent has at least one mutation that perturbs the ability of a cysteine residue within the peptide loop to undergo iron-dependent oxidation.
- Embodiments also include diagnostic kits that can be used to identify a subject suffering from a neurodegenerative disease or a subject at risk of contracting a neurodegenerative disease. These diagnostic kits can include a nucleic acid that complements a nucleic acid that encodes a wild-type or mutant IRP-2 protein or an antibody that binds wild-type or mutant IRP-2 proteins (collectively referred to as "probes"). Additionally, the diagnostic kits can include various supports for immobilizing a sample, reagents, enzymes, detection chemicals, and instructions.
- Some of the diagnostics approaches described herein identify defects in iron metabolism, which contribute to neurodegenerative phenotypes, such as AD. By detecting a polymorphism in a nucleic acid encoding an IRP-2 protein or in the IRP-2 protein itself, for example, a subject at risk of contracting a neurodegenerative disease can be identified. Other diagnostic approaches involve the detection of aberrant amounts or levels of a nucleic acid encoding a mutant IRP-2 protein or a mutant IRP-2 protein. By monitoring the levels of various polymorphic forms of IRP-2 protein a prognosis for neurodegenerative disease can be made. By one approach, the a ratio of wild-type IRP-2 to each mutant form of IRP-2 (or nucleic acids encoding these molecules) is made and, based upon a comparative analysis to the same ratios generated from healthy and diseased individuals, a prognosis for neurodegenerative disease is made. Additionally, ratios of wild type to total

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 9 -

mutant form of IRP-2 can be generated and used to determine whether a subject is at risk of contracting a neurodegenerative disease. The section below describes several of the nucleic acid embodiments in greater detail. *Nucleic acids encoding mutant IRP-2 polypeptides*

- 5 A family of mutant IRP-2 proteins have been discovered that can be identified by the presence of at least one mutation that perturbs the oxidation and concomitant degradation of the molecule. The nucleic acid embodiments of the invention include nucleotides encoding mutant IRP-2 proteins and fragments thereof. Some embodiments for example, include genomic DNA, RNA, and cDNA encoding these molecules. The nucleic acids encoding mutant IRP-2 proteins can be present in many different organisms including but not limited to insects, animals, and mammals.
- 10 The nucleotide sequences of the invention include, for example: (a) the DNA sequences shown in the sequence listing (SEQ. ID Nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15); (b) nucleotide sequences encoding the amino acid sequences shown in the sequence listing (SEQ. ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16); (c) any nucleotide sequence that hybridizes to the complement of the DNA sequences shown in the sequence listing (EQ. ID Nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15) under stringent conditions, e.g., hybridization to filter-bound DNA in 0.5 M NaHPO<sub>4</sub>, 7.0% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA at 50°C and washing in 0.2 X SSC/0.2% SDS at 50°C; and (d) any nucleotide sequence that hybridizes to the complement of the DNA sequences that encode an amino acid sequence provided in the sequence listing (SEQ. ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16) under less stringent conditions (e.g., hybridization in 0.5 M NaHPO<sub>4</sub>, 7.0% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA at 37°C and washing in 0.2X SSC/0.2% SDS at 37°C.
- 15 Embodiments of the invention also include mutant IRP-2 nucleic acids that are isolated from other organisms (e.g., plants, molds, yeast, insects, animals, and mammals) whether naturally occurring or engineered. Approaches to isolate mutant IRP-2 nucleic acids in other species are provided *infra*. Embodiments also include fragments, modifications, derivatives, and variants of the sequences described above. Desired embodiments, for example, include nucleic acids having at least 9 consecutive bases unique to a mutant IRP-2 nucleic acid or a sequence complementary thereto and preferred fragments of the invention include at least 9 consecutive bases unique to a mutant IRP-2 nucleic acid or a sequence complementary thereto. In this regard, the nucleic acid embodiments can have from 9 to approximately 100 consecutive nucleotides. Some DNA fragments of the invention, for example, include nucleic acids having less than or equal to 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 125, 150, 175, 200, 225, and 240 consecutive nucleotides unique to a mutant IRP-2 nucleic acid and preferably encompass the region provided by the sequence of SEQ. ID Nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15 or a complement thereof. Preferably, the nucleic acid embodiments, however, comprise at least 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, or 19 consecutive nucleotides of a sequence unique to SEQ. ID Nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15 or complement thereof. More preferably, the nucleic acid embodiments comprise at least 20-30 consecutive nucleotides of a sequence unique to SEQ. ID Nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15 or complement thereof.
- 20
- 25
- 30
- 35

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 10 -

The nucleic acid embodiments can also be altered by mutation such as substitutions, additions, or deletions that provide for sequences encoding functionally equivalent molecules. Due to the degeneracy of nucleotide coding sequences, other DNA sequences that encode substantially the same mutant IRP-2 amino acid sequence as depicted in SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16 can be used in some embodiments. These include, but are not limited to, nucleic acid sequences comprising all or unique portions of a mutant IRP-2 nucleic acid or nucleic acids that complement all or unique parts of a mutant IRP-2 nucleic acid that has been altered by the substitution of different codons that encode a functionally equivalent amino acid residue within the sequence, thus producing a silent change, or a functionally non-equivalent amino acid residue within the sequence, thus producing a detectable change.

The nucleic acid sequences described above have biotechnological and diagnostic use, e.g., in nucleic acid hybridization assays, Southern and Northern Blot analysis, etc. and the prognosis of neurodegenerative disease (e.g., Alzheimer's disease). By using the nucleic acid sequences disclosed in the sequence listing SEQ. ID Nos. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15, probes that complement wild type and/or mutant IRP-2 nucleic acids can be designed and manufactured by oligonucleotide synthesis. Desirable probes comprise a nucleic acid sequence that complements a nucleic acid sequence of SEQ. ID Nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15 that is unique to these molecules as compared to SEQ. ID. No. 1. These probes can be used to screen cDNA or genomic libraries from various organisms (e.g., plants, molds, fungi, yeast, insects, animals, and mammals) so as to isolate natural sources of the nucleic acid embodiments. Screening can be by filter hybridization, for example, using duplicate filters. The labeled probe preferably contains at least 15-30 base pairs of a nucleic acid sequence that complements a nucleic acid sequence of (SEQ. ID Nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15) that is unique to these molecules as compared to SEQ. ID. No. 1. The hybridization washing conditions used are preferably of a lower stringency when the cDNA library is derived from an organism different from the type of organism from which the labeled sequence is originated.

With respect to the cloning of a mutant IRP-2 nucleic acid, for example, hybridization can be performed in 0.5M NaHPO<sub>4</sub>, 7.0% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA at 37°C overnight and washing can be performed in 0.2X SSC/0.2% SDS at 37°C. Low stringency conditions are well known to those of skill in the art, and will vary predictably depending on the specific organisms from which the library and the labeled sequences are derived. For guidance regarding such conditions see, for example, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press, N.Y.; and Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.

Further, sequences from nucleic acids complementing a mutant or wild type IRP-2 nucleic acid or portions thereof, can be used to make oligonucleotide primers by conventional oligonucleotide synthesis for use in isolation and diagnostic procedures that employ the Polymerase Chain Reaction (PCR) or other enzyme-mediated nucleic acid amplification techniques. A mutant IRP-2 nucleic acid can be isolated from an organism of interest by performing PCR using two degenerate oligonucleotide primer pools designed on the basis of amino acid sequences within the mutant IRP-2 gene products disclosed herein. The template for the reaction can be cDNA obtained by reverse transcription of mRNA prepared from, for example, cells or tissue

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 11 -

of an organism known or believed to express a mutant IRP-2 RNA. A variety of PCR techniques are familiar to those skilled in the art. For a review of PCR technology, see Molecular Cloning to Genetic Engineering White, B.A. Ed. in *Methods in Molecular Biology* 67: Humana Press, Totowa (1997), the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety and the publication entitled "PCR Methods and Applications" (1991, Cold Spring Harbor Laboratory Press), the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety.

For amplification of mRNAs, it is within the scope of the invention to reverse transcribe mRNA into cDNA followed by PCR (RT-PCR); or, to use a single enzyme for both steps as described in U.S. Patent No. 5,322,770, the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety. Another technique involves the use of Reverse Transcriptase Asymmetric Gap Ligase Chain Reaction (RT-AGLCR), as described by Marshall R.L. et al. (*PCR Methods and Applications* 4:80-84, 1994), the disclosure of which is incorporated herein by reference in its entirety. Briefly, RNA is isolated, following standard procedures, from an appropriate cellular or tissue source. A reverse transcription reaction is performed on the RNA using an oligonucleotide primer specific for the most 5' end of the amplified fragment as a primer of first strand synthesis. The resulting RNA/DNA hybrid is then "tailed" with guanines using a standard terminal transferase reaction. The hybrid is then digested with RNase H, and second strand synthesis is primed with a poly-C primer. Thus, cDNA sequences upstream of the amplified fragment are easily isolated. For a review of cloning strategies which can be used, see e.g., Sambrook et al., 1989, supra.

In each of these amplification procedures, primers on either side of the sequence to be amplified are added to a suitably prepared nucleic acid sample along with dNTPs and a thermostable polymerase, such as Taq polymerase, Pfu polymerase, or Vent polymerase. The nucleic acid in the sample is denatured and the primers are specifically hybridized to complementary nucleic acid sequences in the sample. The hybridized primers are then extended. Thereafter, another cycle of denaturation, hybridization, and extension is initiated. The cycles are repeated multiple times to produce an amplified fragment containing the nucleic acid sequence between the primer sites. PCR has further been described in several patents including US Patents 4,683,195, 4,683,202 and 4,965,188, the disclosure of which is incorporated herein by reference in their entirety.

The primers are selected to be substantially complementary to a portion of the nucleic acid sequence of (SEQ. ID Nos. 3, 5, 7, 8, 11, 13, and 15) that is unique to the mutant IRP-2 nucleic acid, thereby allowing the sequences between the primers to be amplified. Preferably, primers are 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 and 30 nucleotides in length. The formation of stable hybrids depends on the melting temperature ( $T_m$ ) of the DNA. The  $T_m$  depends on the length of the primer, the ionic strength of the solution and the G+C content. The higher the G+C content of the primer, the higher is the melting temperature because G:C pairs are held by three H bonds whereas A:T pairs have only two. The G+C content of the amplification primers of the present invention preferably ranges between 10 and 75 %, more preferably between 35 and 60 %, and most preferably between 40 and 55 %. The appropriate length for primers under a particular set of assay conditions can be empirically determined by one of skill in the art.



WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 12 -

The spacing of the primers relates to the length of the segment to be amplified. In the context of the present invention, amplified segments carrying nucleic acid sequence encoding fragments of a mutant IRP-2 nucleic acid can range in size from at least about 25 bp to 35 kb. Amplification fragments from 25-100 bp are typical, fragments from 50-200 bp are preferred and fragments from 200-300 bp are highly preferred. It will be appreciated that amplification primers can be of any sequence that allows for specific amplification of a region of a mutant IRP-2 nucleic acid and can, for example, include modifications such as restriction sites to facilitate cloning.

The PCR product can be subcloned and sequenced to ensure that the amplified sequences represent the sequences of a mutant IRP-2 gene. The PCR fragment can then be used to isolate a full length cDNA clone by a variety of methods. For example, the amplified fragment can be labeled and used to screen a cDNA library, such as a bacteriophage cDNA library. Alternatively, the labeled fragment can be used to isolate genomic clones via the screening of a genomic library. The identification and characterization of genomic clones from many different organisms (particularly humans) is helpful for designing diagnostic tests and clinical protocols for treating and preventing neurodegenerative disease.

Alternatively, a genomic library can be constructed using DNA obtained from an organism suspected of or known to carry the mutant IRP-2 allele, or a cDNA library can be constructed using RNA from a tissue known, or suspected, to express the mutant IRP-2 allele. The normal IRP-2 gene or any suitable fragment thereof can then be labeled and used as a probe to identify the corresponding mutant IRP-2 allele in such libraries. Preferably, however, the probes complement a sequence of SEQ. ID Nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15 that is unique to these mutant molecules. Clones containing the mutant IRP-2 gene sequences can then be purified and subjected to sequence analysis according to methods well known to those of skill in the art.

Additionally, an expression library can be constructed utilizing cDNA synthesized from, for example, RNA isolated from a tissue known, or suspected, to express a mutant IRP-2 allele in an organism suspected of, or known to carry, such a mutant allele. In this manner, gene products made by the putatively mutant cells can be expressed and screened using standard antibody screening techniques in conjunction with antibodies raised against the wild type or mutant IRP-2 gene product. (For screening techniques, see, for example, Harlow, E. and Lane, eds., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.) By using conventional antibody screening techniques, one can isolate wild type and/or mutant IRP-2 protein from expression libraries of various organisms. In cases where an IRP-2 mutation results in an expressed gene product with altered function (e.g., reduced oxidation of cysteine), a polyclonal set of antibodies against the mutant IRP-2 protein may react with the mutant gene product with high efficiency. Library clones detected via their reaction with such labeled antibodies can be purified and subjected to sequence analysis according to methods well known to those of skill in the art.

Embodiments also encompass (a) DNA vectors that contain any of the foregoing mutant IRP-2 coding sequences and/or their complements (i.e., antisense); (b) DNA expression vectors that contain any of the foregoing mutant IRP-2 coding sequences operatively associated with a regulatory element that directs the expression of the coding sequences; and (c) genetically engineered host cells that contain any of the

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 13 -

foregoing mutant IRP-2 coding sequences operatively associated with a regulatory element that directs the expression of the coding sequences in the host cell. These recombinant constructs are capable of replicating autonomously in a host cell. Alternatively, the recombinant constructs can become integrated into the chromosomal DNA of a host cell. Such recombinant polynucleotides typically comprise a mutant IRP-2 genomic or cDNA polynucleotide of semi-synthetic or synthetic origin by virtue of human manipulation. Therefore, recombinant nucleic acids comprising mutant IRP-2 sequences and complements thereof that are not naturally occurring are provided herein.

Although nucleic acids encoding a mutant IRP-2 protein or nucleic acids having sequences that complement a mutant IRP-2 gene as they appear in nature can be employed, they will often be altered, e.g., by deletion, substitution, or insertion and can be accompanied by sequence not present in humans. As used herein, regulatory elements include, but are not limited to, inducible and non-inducible promoters, enhancers, operators and other elements known to those skilled in the art that drive and regulate expression. Such regulatory elements include, but are not limited to, the cytomegalovirus hCMV immediate early gene, the early or late promoters of SV40 adenovirus, the lac system, the trp system, the TAC system, the TRC system, the major operator and promoter regions of phage A, the control regions of fd coat protein, the promoter for 3-phosphoglycerate kinase, the promoters of acid phosphatase, and the promoters of the yeast  $\alpha$ -mating factors.

In addition, recombinant mutant IRP-2 nucleic acid sequences and their complementary sequences can be engineered so as to modify processing or expression of the protein. For example, and not by way of limitation, the mutant IRP-2 gene can be combined with a promoter sequence and/or ribosome binding site, or a signal sequence can be inserted upstream of coding sequence to permit secretion of the protein and thereby facilitate harvesting or bioavailability. Additionally, a given nucleic acid can be mutated *in vitro* or *in vivo*, to create and/or destroy translation, initiation, and/or termination sequences, or to create variations in coding regions and/or form new restriction sites or destroy preexisting ones, or to facilitate further *in vitro* modification. Any technique for mutagenesis known in the art can be used, including but not limited to, *in vitro* site-directed mutagenesis. (Hutchinson et al., *J. Biol. Chem.*, 253:6551 (1978), herein incorporated by reference).

Further, nucleic acids encoding other proteins or domains of other proteins can be joined to nucleic acids encoding a mutant IRP-2 nucleic acid so as to create a fusion protein. Nucleotides encoding fusion protein embodiments can encode, for example, a full length mutant IRP-2 protein, a truncated mutant IRP-2 protein or a peptide fragment of an mutant IRP-2 protein fused to an unrelated protein or peptide, such as for example, glutathione; an Ig Fc domain, which increases the stability and half life of the resulting fusion protein; or an enzyme, fluorescent protein, luminescent protein which can be used as a marker (e.g., Green Fluorescent Protein ("GFP")). The fusion proteins are also useful as biotechnological tools, as will be discussed *infra*. The section below describes several of the polypeptide embodiments and methods of making these molecules.

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 14 -

*Mutant IRP-2 polypeptides*

Mutant IRP-2 polypeptides, fragments of these molecules, and chemicals that resemble these molecules including, but not limited to peptidomimetics, modified IRP-2 proteins, and derivatives or variants thereof are also embodiments. Mutant IRP-2 polypeptides can be present either naturally or through genetic engineering in a number of organisms (e.g., plants, insects, amphibians, reptiles, birds, other animals, cats, dogs, rodents, primates, humans, and other mammals).

The nucleic acids encoding a mutant IRP-2 protein or fragments thereof, described in the previous section, can be manipulated using conventional techniques in molecular biology so as to create recombinant constructs that express mutant IRP-2 protein or fragments of mutant IRP-2 protein. These polypeptides or derivatives thereof, include but are not limited to, those containing as a primary amino acid sequence all of the amino acid sequence substantially as depicted in the Sequence Listing (SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16) and fragments of SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16 at least three amino acids in length including altered sequences in which functionally equivalent amino acid residues are substituted for residues within the sequence resulting in a silent change. Preferred fragments of a sequence of SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16 are at least three amino acids and comprise amino acid sequence unique to mutant IRP-2 proteins including altered sequences in which functionally equivalent amino acid residues are substituted for residues within the sequence resulting in a silent change. The mutant IRP-2 peptide fragments can be, for example, less than or equal to 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, and 100 amino acids in length so long as said peptide has an amino acid that is unique to a mutant IRP-2 peptide, as compared to SEQ. ID. No. 2.

Embodiments of the invention encompass proteins that are functionally equivalent to the mutant IRP-2 proteins encoded by the nucleotide sequences described in SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16, as judged by any of a number of criteria, including but not limited to the inability to be oxidized, the inability to be ubiquitinated, and the ability to remain stable to proteasome degradation. Such functionally equivalent mutant IRP-2 proteins include, but are not limited to, additions or substitutions of amino acid residues within the amino acid sequence encoded by the mutant IRP-2 nucleotide sequences described above but, which result in a silent change, thus producing a functionally equivalent gene product. For example, embodiments include mutant IRP-2 proteins that have one or more amino acid residues within the mutant IRP-2 polypeptide of SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16 and fragments of SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16 that are substituted by another amino acid of a similar polarity that acts as a functional equivalent, resulting in a silent alteration. Substitutes for an amino acid within the sequence can be selected from other members of the class to which the amino acid belongs. For example, the non-polar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan, and methionine. The polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine, and histidine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 15 -

and glutamic acid. The aromatic amino acids include phenylalanine, tryptophan, and tyrosine.

The mutant IRP-2 polypeptides can be prepared by chemical synthesis methods (such as solid phase peptide synthesis) using techniques known in the art such as those set forth by Merrifield et al., *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149 (1964), Houghten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:51:32 (1985), Stewart and Young (Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem Co., Rockford, IL (1984), and Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N.Y. herein incorporated by reference. Such polypeptides can be synthesized with or without a methionine on the amino terminus. Mutant IRP-2 proteins and fragments of thereof can be employed as biologically active or immunological substitutes for natural, purified mutant IRP-2 proteins and fragments of mutant IRP-2 proteins.

While the mutant IRP-2 proteins can be chemically synthesized, it can be more effective to produce these polypeptides by recombinant DNA technology using techniques well known in the art. Such methods can be used to construct expression vectors containing the mutant IRP-2 nucleotide sequences, for example, and appropriate transcriptional and translational control signals. These methods include, for example, *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. Alternatively, RNA capable of encoding an mutant IRP-2 nucleotide sequence can be chemically synthesized using, for example, synthesizers. See, for example, the techniques described in Oligonucleotide Synthesis, 1984, Gait, M. J. ed., IRL Press, Oxford, which is incorporated by reference herein in its entirety.

In several embodiments, mutant IRP-2 proteins and fragments of mutant IRP-2 proteins are expressed in a cell line. For example, some cells are made to express the IRP-2 polypeptide of SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16 or fragments of SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16. The sequences, constructs, vectors, clones, and other materials comprising these embodiments can advantageously be in enriched or isolated form. As used herein, "enriched" means that the concentration of the material is at least about 2, 5, 10, 100, or 1000 times its natural concentration (for example), advantageously 0.01%, by weight, preferably at least about 0.1% by weight. Enriched preparations from about 0.5%, 1%, 5%, 10%, and 20% by weight are also contemplated. The term "isolated" requires that the material be removed from its original environment (e.g., the natural environment if it is naturally occurring). For example, a naturally-occurring polynucleotide present in a living animal is not isolated, but the same polynucleotide, separated from some or all of the coexisting materials in the natural system, is isolated. It is also advantageous that the sequences be in purified form. The term "purified" does not require absolute purity; rather, it is intended as a relative definition. Isolated proteins have been conventionally purified to electrophoretic homogeneity by Coomassie staining, for example. Purification of starting material or natural material to at least one order of magnitude, preferably two or three orders, and more preferably four or five orders of magnitude is expressly contemplated.

A variety of host-expression vector systems can be utilized to express the mutant IRP-2 proteins and fragments of mutant IRP-2 proteins. Where a mutant IRP-2 protein or fragment of mutant IRP-2 protein is a soluble derivative it can be recovered from the culture, i.e., from the host cell in cases where the peptide or polypeptide is not secreted, and from the culture media in cases where the peptide or polypeptide is secreted by the cells. However, the expression systems also encompass engineered host cells that express the

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 16 -

mutant IRP-2 proteins and fragments of mutant IRP-2 proteins or functional equivalents *in situ*, i.e., anchored in the cell membrane. Purification or enrichment of the mutant IRP-2 protein or fragment thereof from such expression systems can be accomplished using appropriate detergents and lipid micelles and methods well known to those skilled in the art. However, such engineered host cells themselves can be used in situations where it is important not only to retain the structural and functional characteristics of the mutant IRP-2 protein, but to assess biological activity.

The expression systems that can be used include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria (e.g., *E. coli* or *B. subtilis*) transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA or cosmid DNA expression vectors containing IRP-2 nucleotide sequences; yeast (e.g., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformed with recombinant yeast expression vectors containing the mutant IRP-2 nucleotide sequences; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., baculovirus) containing the mutant IRP-2 sequences; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or transformed with recombinant plasmid expression vectors (e.g., Ti plasmid) containing mutant IRP-2 nucleotide sequences; or mammalian cell systems (e.g., COS, CHO, BHK, 293, 3T3) harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells (e.g., metallothionein promoter) or from mammalian viruses (e.g., the adenovirus late promoter; the vaccinia virus 7.5K promoter).

In bacterial systems, a number of expression vectors can be advantageously selected depending upon the use intended for the mutant IRP-2 gene product being expressed. For example, when a large quantity of such a protein is to be produced, for the raising of antibodies to a wild type or mutant IRP-2 protein or fragment of wild type or mutant IRP-2 protein, for example, vectors that direct the expression of high levels of fusion protein products that are readily purified can be desirable. Such vectors include, but are not limited, to the *E. coli* expression vector pUR278 (Ruther et al., *EMBO J.*, 2:1791 (1983), in which the mutant IRP-2 protein or fragment of mutant IRP-2 protein coding sequence can be ligated individually into the vector in frame with the lacZ coding region so that a fusion protein is produced; pIN vectors (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.*, 264:5503-5509 (1989)); and the like. pGEX vectors can also be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. The PGEX vectors are designed to include thrombin or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned target gene product can be released from the GST moiety.

In an insect system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes. The virus grows in *Spodoptera frugiperda* cells. The mutant IRP-2 protein or fragment of mutant IRP-2 protein nucleic acid sequence can be cloned individually into non-essential regions (for example the polyhedrin gene) of the virus and placed under control of an AcNPV promoter (for example the polyhedrin promoter). Successful insertion of the coding sequence will result in inactivation of the polyhedrin gene and production of non-occluded recombinant virus, (i.e., virus lacking the proteinaceous coat

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 17 -

coded for by the polyhedrin gene). These recombinant viruses are then used to infect *Spodoptera frugiperda* cells in which the inserted gene is expressed. (E.g., see Smith et al., *J. Virol.* 46: 584 (1983); and Smith, U.S. Pat. No. 4,215,051).

5 In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems can be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, the nucleotide sequence of interest can be ligated to an adenovirus transcription/translation control complex, e.g., the late promoter and tripartite leader sequence. This chimeric gene can then be inserted in the adenovirus genome by *in vitro* or *in vivo* recombination. Insertion in a non-essential region of the viral genome (e.g., region E1 or E3) will result in a recombinant virus that is viable and capable of expressing the IRP-2 gene product in infected hosts. (E.g., See Logan & Shenk,  
10 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659 (1984)). Specific initiation signals can also be required for efficient translation of inserted mutant IRP-2 nucleotide sequences. These signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where an entire IRP-2 gene or cDNA, including its own initiation codon and adjacent sequences, is inserted into the appropriate expression vector, no additional translational control signals are needed.

15 However, in cases where only a portion of the mutant IRP-2 protein coding sequence is inserted, exogenous translational control signals, including, perhaps, the ATG initiation codon, should be provided. Furthermore, the initiation codon should be in phase with the reading frame of the desired coding sequence to ensure translation of the entire insert. These exogenous translational control signals and initiation codons can be of a variety of origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression can be enhanced by the  
20 inclusion of appropriate transcription enhancer elements, transcription terminators, etc. (See Bittner et al., *Methods in Enzymol.*, 153:516-544 (1987)).

In addition, a host cell strain can be chosen that modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Such modifications (e.g., glycosylation) and processing (e.g., cleavage) of protein products are important for the function of the  
25 protein. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the post-translational processing and modification of proteins and gene products. Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein expressed. To this end, eukaryotic host cells that possess the cellular machinery for proper processing of the primary transcript, glycosylation, and phosphorylation of the gene product can be used. Such mammalian host cells include, but are not limited to,  
30 CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, and WI38.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines that stably express the wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof can be engineered. Rather than using expression vectors that contain viral origins of replication, host cells can be transformed with DNA controlled by appropriate expression control elements (e.g., promoter, enhancer  
35 sequences, transcription terminators, polyadenylation sites, etc.), and a selectable marker. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells are allowed to grow for 1-2 days in an enriched media, and then are switched to a selective media. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 18 -

to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn are cloned and expanded into cell lines. This method is advantageously used to engineer cell lines that express the wild type or mutant IRP-2 proteins or fragments thereof.

A number of selection systems can be used, including but not limited to the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler, et al., *Cell* 11:223 (1977)), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026 (1962)), and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy, et al., *Cell* 22:817 (1980)) genes can be employed in tk<sup>+</sup>, hgprt<sup>+</sup> or aprt<sup>+</sup> cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for the following genes: dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567 (1980)); O'Hare, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981); gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G-418 (Collier-Garapin, et al., *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981)); and hyg<sup>r</sup>, which confers resistance to hygromycin (Santerre, et al., *Gene* 30:147 (1984)).

Alternatively, any fusion protein can be readily purified by utilizing an antibody specific for the fusion protein being expressed. For example, a system described by Janknecht et al. allows for the ready purification of non-denatured fusion proteins expressed in human cell lines. (Janknecht, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8972-8976 (1991)). In this system, the gene of interest is subcloned into a vaccinia recombination plasmid such that the gene's open reading frame is translationally fused to an amino-terminal tag consisting of six histidine residues. Extracts from cells infected with recombinant vaccinia virus are loaded onto Ni<sup>2+</sup>-nitriloacetic acid-agarose columns and histidine-tagged proteins are selectively eluted with imidazole-containing buffers.

The mutant IRP-2 gene products or fragments thereof can also be expressed in plants, insects, and animals so as to create a transgenic organism. Plants and insects of almost any species can be made to express these molecules. Desirable transgenic plant systems having a wild type or mutant IRP-2 or fragment thereof include, for example, *Arabidopsis*, maize, and *Chlamydomonas*. Desirable insect systems having a wild type or mutant IRP-2 or fragment thereof include, for example, *D. melanogaster* and *C. elegans*. Animals of any species, including, but not limited to, amphibians, reptiles, birds, mice, rats, rabbits, guinea pigs, pigs, micro-pigs, goats, dogs, cats, and non-human primates, e.g., baboons, monkeys, and chimpanzees can be used to generate a mutant IRP-2 transgenic animals. Transgenic organisms desirably exhibit germline transfer of mutant IRP-2 proteins or fragments thereof. Some transgenic organisms exhibit complete knockouts or point mutations of one or more existing IRP-2 genes. For example, in one embodiment, a transgenic animal comprises at least one point mutation at a cysteine residue within the peptide loop of IRP-2 corresponding to amino acid residues 136-216 and preferably within the region provided in SEQ. ID. No. 2. The most preferred transgenic animal embodiments have mutations that resemble the mutant IRP-2 fragments provided in SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16.

Any technique known in the art is preferably used to introduce the mutant IRP-2 transgene into animals to produce the founder lines of transgenic animals or to knock out or replace existing IRP-2 genes.

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 19 -

Such techniques include, but are not limited to pronuclear microinjection (Hoppe, P. C. and Wagner, T. E., 1989, U.S. Pat. No. 4,873,191); retrovirus mediated gene transfer into germ lines (Van der Putten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 82:6148-6152 (1985); gene targeting in embryonic stem cells (Thompson et al., *Cell* 56:313-321 (1989); electroporation of embryos (Lo, *Mol. Cell. Biol.* 3:1803-1814 (1983); and sperm-mediated gene transfer (Lavitrano et al., *Cell* 57:717-723 (1989); etc. For a review of such techniques, see Gordon, *Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol.* 115:171-229 (1989), which is incorporated by reference herein in its entirety.

The invention provides for transgenic animals that carry a mutant IRP-2 transgene in all their cells, as well as animals that carry the transgene in some, but not all their cells, i.e., mosaic animals. The transgene can be integrated as a single transgene or in concatamers, e.g., head-to-head tandems or head-to-tail tandems. The transgene can also be selectively introduced into and activated in a particular cell type by following, for example, the teaching of Lasko et al. (Lasko, M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6232-6236 (1992)). The regulatory sequences required for such a cell-type specific activation will depend upon the particular cell type of interest, and will be apparent to those of skill in the art.

When it is desired that the mutant IRP-2 gene transgene be integrated into the chromosomal site of the endogenous mutant IRP-2 gene, gene targeting is preferred. Briefly, when such a technique is to be utilized, vectors containing some nucleotide sequences homologous to the endogenous mutant IRP-2 gene are designed for the purpose of integrating, via homologous recombination with chromosomal sequences, into and disrupting the function of the nucleotide sequence of the endogenous mutant IRP-2 gene. The transgene can also be selectively introduced into a particular cell type, thus inactivating the endogenous mutant IRP-2 gene in only that cell type, by following, for example, the teaching of Gu et al. (Gu, et al., *Science* 265: 103-106 (1994)). The regulatory sequences required for such a cell-type specific inactivation will depend upon the particular cell type of interest, and will be apparent to those of skill in the art.

Once transgenic animals have been generated, the expression of the recombinant mutant IRP-2 gene, for example, can be assayed utilizing standard techniques. Initial screening can be accomplished by Southern blot analysis or PCR techniques to analyze animal tissues to assay whether integration of the transgene has taken place. The level of mRNA expression of the transgene in the tissues of the transgenic animals can also be assessed using techniques which include, but are not limited to, Northern blot analysis of cells obtained from the animal, *in situ* hybridization analysis, and RT-PCR. Samples of mutant IRP-2 gene-expressing cells can also be evaluated immunocytochemically using antibodies specific for the mutant IRP-2 transgene product.

In addition to the naturally occurring polypeptide embodiments, derivative or modified molecules that produce a more desirable cellular response are within the scope of the invention. For example, a derivative mutant IRP-2 molecule can include a polypeptide that has been engineered to have one or more cysteine residues incorporated into the protein so as to promote the formation of a derivative that undergoes greater oxidation. The introduction of a cysteine residue in a polypeptide can be accomplished using conventional molecular biology techniques.



WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 20 -

Additional embodiments include peptidomimetics that resemble a mutant IRP-2 polypeptide. The naturally occurring amino acids employed in the biological production of peptides all have the L-configuration. Synthetic peptides can be prepared employing conventional synthetic methods, utilizing L-amino acids, D-amino acids, or various combinations of amino acids of the two different configurations. Synthetic compounds that mimic the conformation and desirable features of a particular peptide, e.g., an oligopeptide, once such peptide has been found, but that avoids the undesirable features, e.g., flexibility (loss of conformation) and bond breakdown are known as a "peptidomimetics". (See, e.g., Spatola, A. F. *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins* (Weinstein, B. Ed.), Vol. 7, pp. 267-357, Marcel Dekker, New York (1983), which describes the use of the methylenethio bioisostere [ $\text{CH}_2 \text{S}$ ] as an amide replacement in enkephalin analogues; and Szelke et al., *In peptides: Structure and Function*, Proceedings of the Eighth American Peptide Symposium, (Hruby and Rich, Eds.), pp. 579-582, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1983), which describes renin inhibitors having both the methyleneamino [ $\text{CH}_2 \text{NH}$ ] and hydroxyethylene [ $\text{CHOHCH}_2$ ] bioisosteres at the Leu-Val amide bond in the 6-13 octapeptide derived from angiotensinogen).

In general, the design and synthesis of a peptidomimetic involves starting with the amino acid sequence of the peptide and conformational data (e.g., geometry data, such as bond lengths and angles) of a desired peptide (e.g., the most probable simulated peptide). That data is then used to determine the geometries that should be designed into the peptidomimetic. Numerous methods and techniques are known in the art for performing this step, any of which could be used. (See, e.g., Farmer, P. S., *Drug Design* (Ariens, E. J. ed.), Vol. 10, pp. 119-143 (Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney and San Francisco) (1980); Farmer, et al., in *TIPS*, 9/82, pp. 362-365; Verber et al., in *TINS*, 9/85, pp. 392-396; Kaltenbronn et al., in *J. Med. Chem.* 33: 838-845 (1990); and Spatola, A. F., in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, Vol. 7, pp. 267-357, Chapter 5, "Peptide Backbone Modifications: A Structure-Activity Analysis of Peptides Containing Amide Bond Surrogates. Conformational Constraints, and Relations" (B. Weinstein, ed.; Marcel Dekker: New York, pub.) (1983); Kemp, D. S., "Peptidomimetics and the Template Approach to Nucleation of  $\beta$ -sheets and  $\alpha$ -helices in Peptides," *Tibech*, Vol. 8, pp. 249-255 (1990). Additional teachings can be found in U.S. Patent Nos. 5,288,707; 5,552,534; 5,811,515; 5,817,626; 5,817,879; 5,821,231; and 5,874,529. The section below describes the preparation and use of antibodies directed to wild type or mutant IRP-2 proteins or fragments thereof.

#### 30 Anti-IRP-2 antibodies

Following synthesis or expression and isolation or purification of an IRP-2 protein or a portion thereof, the isolated or purified protein can be used to generate monoclonal or polyclonal antibodies or both. Depending on the context, the term "antibodies" can encompass polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments and fragments produced by a Fab expression library. Antibodies that recognize a mutant or wild type IRP-2 protein or fragments thereof have many uses including, but not limited to, biotechnological applications, therapeutic/prophylactic applications, and diagnostic applications.

For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, rats, mice, etc. can be immunized by injection with a mutant or wild type IRP-2 protein or any portion, fragment or oligopeptide that retains immunogenic properties. Depending on the host species, various adjuvants can be used to increase immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminum hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin (KLH), and dinitrophenol. BCG (Bacillus Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum* are also potentially useful adjuvants.

Peptides used to induce specific antibodies can have an amino acid sequence consisting of at least three amino acids, and preferably at least 10 to 15 amino acids. Preferably, short stretches of amino acids encoding fragments of a mutant or wild type IRP-2 protein are fused with those of another protein such as keyhole limpet hemocyanin (KLH) such that an antibody is produced against the chimeric molecule. While antibodies capable of specifically recognizing a mutant or wild type IRP-2 protein can be generated by injecting synthetic 3-mer, 10-mer, and 15-mer peptides that correspond to a protein sequence of a mutant or wild type IRP-2 protein into mice, a more diverse set of antibodies can be generated by using recombinant mutant or wild type IRP-2 protein or fragments thereof.

To generate antibodies to a mutant or wild type IRP-2 protein or fragments thereof, substantially pure protein is isolated from a transfected or transformed cell. The concentration of the polypeptide in the final preparation is adjusted, for example, by concentration on an Amicon filter device, to the level of a few micrograms/ml. Monoclonal or polyclonal antibody to the polypeptide of interest can then be prepared as follows:

Monoclonal antibodies can be prepared using any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique originally described by Kohler and Milstein (*Nature* 256:495-497 (1975)), the human B-cell hybridoma technique (Kosbor et al. *Immunol Today* 4:72 (1983); Cote et al. *Proc Natl Acad Sci* 80:2026-2030 (1983)), and the EBV-hybridoma technique (Cole et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss Inc, New York N.Y., pp 77-96 (1985)). In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies", the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used. (Morrison et al. *Proc Natl Acad Sci* 81:6851-6855 (1984); Neuberger et al. *Nature* 312:604-608(1984); Takeda et al. *Nature* 314:452-454(1985)). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Pat. No. 4,946,778) can be adapted to produce single chain antibodies specific for a mutant or wild type IRP-2 protein. Antibodies can also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in Orlandi et al., *Proc Natl Acad Sci* 86: 3833-3837 (1989), and Winter G. and Milstein C; *Nature* 349:293-299 (1991).

Antibody fragments that contain specific binding sites for a mutant or wild type IRP-2 protein or fragments thereof can also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, the F(ab')<sub>2</sub> fragments that can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments that can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')<sub>2</sub> fragments. Alternatively, Fab expression

WO 02/12284

- 22 -

PCT/US01/24747

libraries can be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity. (Huse W. D. et al. *Science* 256:1275-1281 (1989)).

By one approach, monoclonal antibodies are made as follows. Briefly, a mouse is repetitively inoculated with a few micrograms of the selected protein or peptides derived therefrom over a period of a few weeks. The mouse is then sacrificed, and the antibody producing cells of the spleen isolated. The spleen cells are fused in the presence of polyethylene glycol with mouse myeloma cells, and the excess unfused cells destroyed by growth of the system on selective media comprising aminopterin (HAT media). The successfully fused cells are diluted and aliquots of the dilution placed in wells of a microtiter plate where growth of the culture is continued. Antibody-producing clones are identified by detection of antibody in the supernatant fluid of the wells by immunoassay procedures, such as ELISA, as originally described by Engvall, E., *Meth. Enzymol.* 70:419 (1980), and derivative methods thereof. Selected positive clones can be expanded and their monoclonal antibody product harvested for use. Detailed procedures for monoclonal antibody production are described in Davis, L. et al. *Basic Methods in Molecular Biology* Elsevier, New York. Section 21-2.

Polyclonal antiserum containing antibodies to heterogeneous epitopes of a single protein can be prepared by immunizing suitable animals with the expressed protein or peptides derived therefrom described above, which can be unmodified or modified to enhance immunogenicity. Effective polyclonal antibody production is affected by many factors related both to the antigen and the host species. For example, small molecules tend to be less immunogenic than others and can require the use of carriers and adjuvant. Also, host animals vary in response to site of inoculations and dose, with both inadequate or excessive doses of antigen resulting in low titer antisera. Small doses (ng level) of antigen administered at multiple intradermal sites appears to be most reliable. An effective immunization protocol for rabbits can be found in Vaitukaitis, J. et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33:988-991 (1971).

Booster injections can be given at regular intervals, and antiserum harvested when antibody titer thereof, as determined semi-quantitatively, for example, by double immunodiffusion in agar against known concentrations of the antigen, begins to fall. See, for example, Ouchterlony, O. et al., Chap. 19 in: *Handbook of Experimental Immunology* D. Wier (ed) Blackwell (1973). Plateau concentration of antibody is usually in the range of 0.1 to 0.2 mg/ml of serum (about 12IM). Affinity of the antisera for the antigen is determined by preparing competitive binding curves, as described, for example, by Fisher, D., Chap. 42 in: *Manual of Clinical Immunology*, 2d Ed. (Rose and Friedman, Eds.) Amer. Soc. For Microbiol., Washington, D.C. (1980). Antibody preparations prepared according to either protocol are useful in quantitative immunoassays that determine concentrations of antigen-bearing substances in biological samples; they are also used semi-quantitatively or qualitatively (e.g., in diagnostic embodiments that identify the presence of a mutant or wild type IRP-2 protein in biological samples). An example of the preparation of antibodies specific for oxidized and reduced forms of wild type and mutant forms of IRP-2 is provided *infra*. The section below describes several IRP-2 characterization assays that evaluate the properties of wild type and mutant IRP-2 nucleic acids and proteins. *Example 1* describes an approach that was used to make and screen antibodies that are specific for wild type and mutant

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 23 -

IRP-2 and Example 2 describes a similar approach that was used to make and screen an antibody specific for wild type IRP-2.

*IRP-2 characterization assays*

5 The term "IRP-2 characterization assay" or "IRP-2 functional assay" or "functional assay" include assays that directly or indirectly evaluate the presence of a wild type or mutant IRP-2 nucleic acid or protein in a cell and the ability of wild type or mutant IRP-2 protein to associate with a membrane, interact with another molecule (e.g., ubiquitin), and/or undergo iron-dependent oxidation and proteasome degradation.

10 Some functional assays involve binding assays that utilize multimeric agents. One form of multimeric agent concerns a manufacture comprising a wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof disposed on a support. These multimeric agents provide the wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof in such a form or in such a way that a sufficient affinity is achieved. A multimeric agent having a n wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof is obtained by joining the desired polypeptide to a macromolecular support. A "support" can be a termed a carrier, a protein, a resin, a cell membrane, or any macromolecular structure  
15 used to join or immobilize such molecules. Solid supports include, but are not limited to, the walls of wells of a reaction tray, test tubes, polystyrene beads, magnetic beads, nitrocellulose strips, membranes, microparticles such as latex particles, animal cells, Duracyte®, artificial cells, and others. A wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof can also be joined to inorganic carriers, such as silicon oxide material (e.g., silica gel, zeolite, diatomaceous earth or aminated glass) by, for example, a covalent linkage through a hydroxy,  
20 carboxy or amino group and a reactive group on the carrier.

In several multimeric agents, the macromolecular support has a hydrophobic surface that interacts with a portion of wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof by a hydrophobic non-covalent interaction. In some cases, the hydrophobic surface of the support is a polymer such as plastic or any other polymer in which hydrophobic groups have been linked such as polystyrene, polyethylene or polyvinyl.  
25 Additionally, a wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof can be covalently bound to carriers including proteins and oligo/polysaccharides (e.g. cellulose, starch, glycogen, chitosane or aminated sepharose). In these later multimeric agents, a reactive group on the molecule, such as a hydroxy or an amino group, is used to join to a reactive group on the carrier so as to create the covalent bond. Additional multimeric agents comprise a support that has other reactive groups that are chemically activated so as to  
30 attach the wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof. For example, cyanogen bromide activated matrices, epoxy activated matrices, thio and thiopropyl gels, nitrophenyl chloroformate and N-hydroxy succinimide chloroformate linkages, or oxirane acrylic supports are used. (Sigma).

Furthermore, in some embodiments, a liposome or lipid bilayer (natural or synthetic) is contemplated as a support and wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof are attached to the membrane surface  
35 or are incorporated into the membrane by techniques in liposome engineering. By one approach, liposome multimeric supports comprise a wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof that is exposed on the

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 24 -

surface. A hydrophobic domain can be joined to the wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof so as to facilitate the interaction with the membrane.

The insertion of linkers, such as linkers (e.g., "λ linkers" engineered to resemble the flexible regions of λ phage) of an appropriate length between the wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof and the support are also contemplated so as to encourage greater flexibility of the polypeptide of interest and thereby overcome any steric hindrance that can be presented by the support. The determination of an appropriate length of linker that allows for an optimal cellular response or lack thereof, can be determined by screening the wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof with varying linkers in the assays detailed in the present disclosure.

In other embodiments, the multimeric supports discussed above can have attached multimerized wild type or mutant IRP-2 protein or fragments thereof so as to create a "multimerized-multimeric support". A multimerized ligand can, for example, be obtained by coupling two or more polypeptides in tandem using conventional techniques in molecular biology. The multimerized form of the wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof can be advantageous for many applications because of the ability to obtain an agent with a higher affinity, for example. The incorporation of linkers or spacers, such as flexible λ linkers, between the individual domains that make-up the multimerized agent can also be advantageous for some embodiments. The insertion of λ linkers of an appropriate length can encourage greater flexibility in the molecule and can overcome steric hindrance. Similarly, the insertion of linkers between the multimerized wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof and the support can encourage greater flexibility and limit steric hindrance presented by the support. The determination of an appropriate length of linker can be determined by screening the wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof with varying linkers with antibodies directed to epitopes on the wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof. *Example 3* describes an approach that was used to attach the anti-IRP antibodies, made according to *Examples 1 or 2*, to beads.

Thus, several approaches to identify agents that interact with a wild type or mutant IRP-2 protein or fragment thereof, employ the support-bound agents described above. Once the support-bound agent is obtained, for example, molecules (e.g., antibodies or ubiquitin) are contacted to the support-bound agent and an association is determined directly (e.g., by using labeled antibody or ubiquitin) or indirectly (e.g., by using a labeled antibody directed to the anti-IRP-2 antibody or ubiquitin). In some assays, it is desired to oxidize or reduce the support-bound wild type or mutant IRP-2 prior to contacting it with a binding partner such as ubiquitin. Such oxidation can be achieved in the presence of a sufficient concentration of iron (e.g., FeCl<sub>3</sub>) although those of skill will appreciate many other ways of oxidizing a support-bound IRP-2 protein or fragment thereof. An approach to oxidize IRP-2 is provided in Iwai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:4924 (1998), herein expressly incorporated by reference in its entirety.

In one characterization assay, for example, the ability of mutant support-bound IRP-2 peptides to undergo oxidation and ubiquitination is compared with the ability of wild type support-bound IRP-2 peptides to undergo oxidation and ubiquitination. By one method, oxidation of support bound IRP-2 is performed at the concentration of 0.1:μg:1 protein in a 20:1 reaction mixture (25mM Hepes-NaOH, pH 7.2 and 40mM KCl) in the

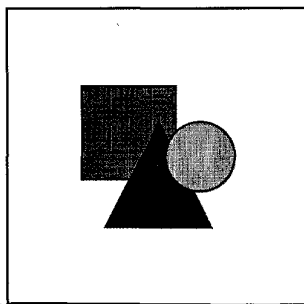
WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 25 -

presence of 50 mM FeCl<sub>2</sub> and 10 mM DTT at 37°C for 15-30 minutes. In some embodiments, it is desired to use Tris-carboxyethyl-phosphine (TCEP) at 1 mM to reduce the disulfides instead of DTT. In particular, when reduced IPR-2 is desired, preferably, TCEP at 1 mM is used in a reaction mixture without iron for 15-30 minutes at 37°C.

- 5 Once the oxidized and/or reduced IRP-2 supports are made, an *in vitro* ubiquitination assay can be performed as follows. The oxidized and/or reduced support-bound wild type and mutant IRP-2 is added to 400:g RD4 S100 lysates, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP, 2 mM DTT, 6:g ubiquitin, 25 mM Tris-Cl (pH 7.6) and 60 mM KCl for 5 minutes. Reactions are stopped by adding ice cold buffer containing 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 10 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 0.1% SDS. The support bound conjugate is washed in this buffer three times; the beads are spun down at 1500xg between washes. The beads are boiled for 10 minutes in 2X Laemmli buffer and are separated on a suitable SDS PAGE (e.g., 6%-15%). The separated proteins are transferred to a membrane by electroblotting and the presence of ubiquitin can be verified by Western blotting with an affinity purified polyclonal or monoclonal anti-ubiquitin antibody. This assay will verify the ability of oxidized and reduced forms of mutant and wild type IRP-2 to interact with ubiquitin.
- 15 By another approach, the wild type and mutant support bound IRP-2 peptides are oxidized (e.g., exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or iron) and the ability of the support bound agents to interact with radiolabeled ubiquitin is determined. Controls may include support bound agents that are reduced with TCEP. For example, aliquots of the support bound wild type and mutant IRP-2 proteins are exposed for 5, 10, 15, and 30 min to 0.02 mM, 0.05 mM, 0.07 mM, and 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, containing a mixture of inhibitors of proteinase and isopeptidase (5 mM EDTA, 10 μM hemin, 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzene sulfonyl fluoride, 1 mM E-64, and 2 μg/ml aprotinin, and 10 mM iodoacetamide). Next, the assay is brought to a final volume of 20 50 μl, containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mM AMP-PNP, 2 μg of <sup>125</sup>I-ubiquitin at



approx. 10<sup>6</sup> cpm), 1 μM ubiquitin aldehyde, and 30 μl of support bound IRP-2 (approx. 10 mg of protein/ml).

- 25 Following incubation at 37 °C for 20 min, the support bound IRP2 - ubiquitin conjugates are spun down at 1500xg for 30 seconds and washed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mM AMP-PNP. This washing procedure is repeated three times. The radioactivity associated with the support bound

WO 02/12284

- 26 -

PCT/US01/24747

IRP-2 can be determined by scintillation. This approach directly detects the amount of ubiquitin that can associate with a mutant or wild type IRP-2 polypeptide.

Alternatively, the reaction above can be stopped by addition of 50  $\mu$ l of 2  $\times$  Laemmli buffer and boiling at 100  $^{\circ}$ C for 10 min. Subsequently, the proteins are separated on a 15% SDS-PAGE. The proteins are transferred to nylon by electroblot and the membrane is dried. The membrane is exposed to film for 2-4 days and, subsequently, a northern blot with an anti-IRP-2 antibody is performed. Detection of the bound antibody can be accomplished with a secondary antibody that is conjugated to gold or horse radish peroxidase, for example. In this manner, both ubiquitin and the IRP-2 proteins are detected. The level of ubiquitin conjugate can also be quantified by densitometry of the autoradiogram.

Additionally, a cell based characterization assay can be performed. For example, COS cells can be transfected to express mutant and/or wild type IRP-2 proteins. (See e.g., Samaniego et al., *J. Biol. Chem.* 269:30904 (1994), herein expressly incorporated by reference in its entirety, for a protocol for transfecting COS cells to express wild type IRP-2). After selecting transformants, aliquots of the positive expressing cells are placed under oxidative stress. By one approach, oxidative stress is brought about by raising the concentration of ferric ammonium citrate in the medium to 400:gm/l. By another approach, exposure to oxidative stress is accomplished in a serum- and phenol red-free medium containing 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min. The cells are collected immediately or are cultured in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or iron-free medium to allow them to recover from oxidative stress. Control cells are treated exactly as the exposed cells except that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or iron are not included in the medium. The viability of the cells after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or iron can be monitored by exclusion of trypan blue and 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide staining. The levels of reduced glutathione can also be determined. Further, the levels of ATP in the cells can be monitored using the bioluminescent somatic cell assay kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions.

Cells are then harvested after the 30 min exposure to 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or iron and homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, containing a mixture of inhibitors of proteinase and isopeptidase (5 mM EDTA, 10  $\mu$ M hemin, 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzene sulfonyl fluoride, 1 mM E-64, and 2  $\mu$ g/ml aprotinin, and 10 mM iodoacetamide). Following SDS-PAGE (8%) separation and transfer to nitrocellulose, the blots are probed with an affinity purified polyclonal antibody or monoclonal antibody to ubiquitin, followed by incubation with <sup>125</sup>I-protein A. The ubiquitin and ubiquitin conjugates are detected by autoradiography and quantified by image analysis.

Alternatively, the cells are harvested and homogenized in 50 mM Tris, 1 mM DTT, pH 7.6. Ubiquitin conjugation activity in the cell supernatant is quantified as the ability to catalyze the formation of conjugates between endogenous protein substrates and exogenous <sup>125</sup>I-labeled ubiquitin. This assay is done in a final volume of 50  $\mu$ l, containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2 mM AMP-PNP, 2  $\mu$ g of <sup>125</sup>I-ubiquitin approx. 10<sup>6</sup> cpm, 1  $\mu$ M ubiquitin aldehyde, and 30  $\mu$ l of cell supernatant (10 mg of protein/ml). The reaction is started with addition of 30  $\mu$ l of cell supernatant. Following incubation at 37  $^{\circ}$ C for 20 min, the reaction is stopped by addition of 50  $\mu$ l of 2  $\times$  Laemmli buffer. After boiling at 100  $^{\circ}$ C for 10 min, proteins in 20  $\mu$ l of the mixture are separated by a 15% SDS-PAGE. For a negative control, a parallel experiment is done in

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 27 -

which AMP-PNP is replaced with 4.5 units of hexokinase and 12 mM 2-deoxyglucose. After drying the gel, it is exposed to film for 2-4 days. The level of ubiquitin conjugates can be quantified by densitometry of the autoradiogram. By employing the characterization assays described above, the ability of mutant and wildtype IRP-2 proteins to undergo oxidation and ubiquitination can be readily determined. (See also Shang et al., *J. Biol. Chem.* 272: 23086 (1997), herein expressly incorporated by reference in its entirety, for more ubiquitin assays that can be adapted for IRP-2 - ubiquitin conjugate analysis.)

In light of the disclosure herein, one of skill will appreciate that such assays can be used to assess the ability of various forms of IRP-2 proteins to be selected for proteosome degradation and indicate forms of IRP-2 that are associated with neurodegenerative disease. In the disclosure below, several diagnostic embodiments are described.

#### *Diagnostic embodiments*

Generally, the diagnostic embodiments can be classified according to whether it is a nucleic acid or protein-based assay. Some diagnostic assays detect mutations or polymorphisms in IRP-2 nucleic acids or proteins, which contribute to aberrations in oxidation, ubiquitination, and proteosome degradation. Other diagnostic assays identify and distinguish defects in oxidation, ubiquitination, and proteosome degradation by detecting a level of mutant and/or wild type IRP-2 RNA or protein in a tested organism that resembles the level of mutant and/or wild type IRP-2 RNA or protein in a organism suffering from a disease or by detecting a level of mutant and/or wild type IRP-2 RNA or protein in a tested organism that is different than the level of mutant and/or wild type IRP-2 an organism not suffering from a disease.

Additionally, the manufacture of kits that incorporate the reagents and methods described in the following embodiments so as to allow for the rapid detection and identification of neurodegenerative disease are contemplated. The diagnostic kits can include a nucleic acid probe or an antibody or combinations thereof, which specifically detect a mutant or wild type form of IRP-2 nucleic acid or protein or a nucleic acid probe or an antibody or combinations thereof, which can be used to determine the level of RNA or protein expression of a wild type or mutant IRP-2. The detection component of these kits will typically be supplied in combination with one or more of the following reagents. A support capable of absorbing or otherwise binding DNA, RNA, or protein will often be supplied. Available supports include membranes of nitrocellulose, nylon or derivatized nylon that can be characterized by bearing an array of positively charged substituents. One or more restriction enzymes, control reagents, buffers, amplification enzymes, non-human polynucleotides like calf-thymus or salmon-sperm DNA, and a set of instructions that describe how to diagnose a neurodegenerative disease (e.g., Alzheimer's disease) with the tools in the kit can also be supplied.

Useful nucleic acid-based diagnostic techniques include, but are not limited to, direct DNA sequencing, Southern Blot analysis, single-stranded confirmation analysis (SSCA), RNase protection assay, dot blot analysis, nucleic acid amplification, and combinations of these approaches. The starting point for these analysis is isolated or purified nucleic acid from a biological sample. It is contemplated that blood from a subject would be a suitable biological sample. Further, if the diagnostic assay is designed to determine the



WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 28 -

presence of a mutant or polymorphic IRP-2, any source of DNA including, but not limited to hair, cheek cells and skin cells can be used as a biological sample. The nucleic acid is extracted from the sample and can be amplified by a DNA amplification technique such as the Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers that correspond to regions flanking DNA that encodes amino acid residues recognized as a polymorphism that contributes to a defect in oxidation, ubiquitination, and proteosome degradation, thus, providing a prognosis of neurodegenerative disease.

Once a sufficient amount of DNA is obtained from an individual to be tested, several methods can be used to detect an IRP-2 polymorphism. Direct DNA sequencing, either manual sequencing or automated fluorescent sequencing can detect such sequence variations. Another approach is the single-stranded confirmation polymorphism assay (SSCA) (Orita et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2776-2770 (1989), herein expressly incorporated by reference in its entirety). This method, however, does not detect all sequence changes, especially if the DNA fragment size is greater than 200 base pairs, but can be optimized to detect most DNA sequence variation.

The reduced detection sensitivity is a disadvantage, but the increased throughput possible with SSCA makes it an attractive, viable alternative to direct sequencing for mutation detection. The fragments that have shifted mobility on SSCA gels are then sequenced to determine the exact nature of the DNA sequence variation. Other approaches based on the detection of mismatches between the two complementary DNA strands include clamped denaturing gel electrophoresis (CDGE) (Sheffield et al., *Am. J. Hum. Genet.* 49:699-706 (1991)), heteroduplex analysis (HA) (White et al., *Genomics* 12:301-306 (1992)), and chemical mismatch cleavage (CMC) (Grompe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5855-5892 (1989)). A review of currently available methods of detecting DNA sequence variation can be found in Grompe, *Nature Genetics* 5:111-117 (1993).

Seven well-known nucleic acid-based methods for confirming the presence of a polymorphism are described below. Provided for exemplary purposes only and not intended to limit any aspect of the invention, these methods include:

- (1) single-stranded confirmation analysis (SSCA) (Orita et al.);
- (2) denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Wartell et al., *Nucl. Acids Res.* 18:2699-2705 (1990) and Sheffield et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:232-236 (1989)), both references herein incorporated by reference;
- (3) RNase protection assays (Finkelstein et al., *Genomics* 7:167-172 (1990) and Kinszler et al., *Science* 251:1366-1370 (1991)) both references herein incorporated by reference;
- (4) the use of proteins which recognize nucleotide mismatches, such as the *E. Coli* mutS protein (Modrich, *Ann. Rev. Genet.* 25:229-253 (1991), herein incorporated by reference;
- (5) allele-specific PCR (Rano and Kidd, *Nucl. Acids Res.* 17:8392 (1989), herein incorporated by reference), which involves the use of primers that hybridize at their 3' ends to a

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 29 -

polymorphism and, if the polymorphism is not present, an amplification product is not observed; and

- (6) Amplification Refractory Mutation System (ARMS), as disclosed in European Patent Application Publication No. 0332435 and in Newton et al., *Nucl. Acids Res.* 17:2503-2516 (1989), both references herein incorporated by reference; and
- (7) temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE), as described by Bio-Rad in U.S./E.G. Bulletin 2103, herein incorporated by reference.

In SSCA, DGGE, TTGE, and RNase protection assay, a new electrophoretic band appears when the polymorphism is present. SSCA and TTGE detect a band that migrates differentially because the sequence change causes a difference in single-strand, intramolecular base pairing, which is detectable electrophoretically. RNase protection involves cleavage of the mutant polynucleotide into two or more smaller fragments. DGGE detects differences in migration rates of sequences using a denaturing gradient gel. In an allele-specific oligonucleotide assay (ASOs) (Conner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:278-282 (1983)), an oligonucleotide is designed that detects a specific sequence, and an assay is performed by detecting the presence or absence of a hybridization signal. In the mutS assay, the protein binds only to sequences that contain a nucleotide mismatch in a heteroduplex between polymorphic and non-polymorphic sequences. Mismatches, in this sense of the word refers to hybridized nucleic acid duplexes in which the two strands are not 100% complementary. The lack of total homology results from the presence of one or more polymorphisms in an amplicon obtained from a biological sample, for example, that has been hybridized to a non-polymorphic strand. Mismatched detection can be used to detect point mutations in DNA or in an mRNA. While these techniques are less sensitive than sequencing, they are easily performed on a large number of biological samples and are amenable to array technology.

In some embodiments, nucleic acid probes that differentiate polynucleotides encoding wild type IRP-2 from mutant IRP-2 are attached to a support in an ordered array, wherein the nucleic acid probes are attached to distinct regions of the support that do not overlap with each other. Preferably, such an ordered array is designed to be "addressable" where the distinct locations of the probe are recorded and can be accessed as part of an assay procedure. These probes are joined to a support in different known locations. The knowledge of the precise location of each nucleic acid probe makes these "addressable" arrays particularly useful in binding assays. The nucleic acids from a preparation of several biological samples are then labeled by conventional approaches (e.g., radioactivity or fluorescence) and the labeled samples are applied to the array under conditions that permit hybridization.

If a nucleic acid in the samples hybridizes to a probe on the array, then a signal will be detected at a position on the support that corresponds to the location of the hybrid. Since the identity of each labeled sample is known and the region of the support on which the labeled sample was applied is known, an identification of the presence of the polymorphic variant can be rapidly determined. These approaches are

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 30 -

easily automated using technology known to those of skill in the art of high throughput diagnostic or detection analysis.

5 Additionally, an opposite approach to that presented above can be employed. Nucleic acids present in biological samples can be disposed on a support so as to create an addressable array. Preferably, the samples are disposed on the support at known positions that do not overlap. The presence of nucleic acids having a desired polymorphism in each sample is determined by applying labeled nucleic acid probes that complement nucleic acids that encode the polymorphism and detecting the presence of a signal at locations on the array that correspond to the positions at which the biological samples were disposed. Because the identity of the biological sample and its position on the array is known, the identification of the polymorphic variant can be rapidly determined. These approaches are also easily automated using technology known to those of skill in the art of high throughput diagnostic analysis.

10 Any addressable array technology known in the art can be employed with this aspect of the invention. One particular embodiment of polynucleotide arrays is known as Genechips™, and has been generally described in US Patent 5,143,854; PCT publications WO 90/15070 and 92/10092. These arrays are generally produced using mechanical synthesis methods or light directed synthesis methods, which incorporate a combination of photolithographic methods and solid phase oligonucleotide synthesis. (Fodor et al., *Science*, 251:767-777, (1991)). The immobilization of arrays of oligonucleotides on solid supports has been rendered possible by the development of a technology generally identified as "Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis" (VLSIPS™) in which, typically, probes are immobilized in a high density array on a solid surface of a chip. Examples of VLSIPS™ technologies are provided in US Patents 5,143,854 and 5,412,087 and in PCT Publications WO 90/15070, WO 92/10092 and WO 95/11995, which describe methods for forming oligonucleotide arrays through techniques such as light-directed synthesis techniques. In designing strategies aimed at providing arrays of nucleotides immobilized on solid supports, further presentation strategies were developed to order and display the oligonucleotide arrays on the chips in an attempt to maximize hybridization patterns and diagnostic information. Examples of such presentation strategies are disclosed in PCT Publications WO 94/12305, WO 94/11530, WO 97/29212, and WO 97/31256.

20 A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and can be used in various nucleic acid assays. There are several ways to produce labeled nucleic acids for hybridization or PCR including, but not limited to, oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, a nucleic acid encoding an IRP-2 can be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and can be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3 or SP6 and labeled nucleotides. A number of companies such as Pharmacia Biotech (Piscataway N.J.), Promega (Madison Wis.), and U.S. Biochemical Corp (Cleveland Ohio) supply commercial kits and protocols for these procedures. Suitable reporter molecules or labels include those radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents, as well as, substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles and the like.

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 31 -

The RNase protection method, briefly described above, is an example of a mismatch cleavage technique that is amenable to array technology. Preferably, the method involves the use of a labeled riboprobe that is complementary to an IRP-2 sequence having a polymorphism. However, the method can involve the use of a labeled riboprobe that is complementary to an IRP-2 sequence having the wild type gene.

5 The riboprobe and either mRNA or DNA isolated and amplified from a biological sample are annealed (hybridized) and subsequently digested with the enzyme RNase A, which is able to detect mismatches in a duplex RNase structure. If a mismatch is detected by RNase A, the polymorphic variant is not present in the sample and the enzyme cleaves at the site of the mismatch and destroys the riboprobe. Thus, when the annealed RNA is separated on an electrophoretic gel matrix, if a mismatch has been detected and cleaved by

10 RNase A, an RNA product will be seen which is much smaller than the full length duplex RNA for the riboprobe and the mRNA or DNA.

Complements to the riboprobe can also be dispersed on an array and stringently probed with the products from the RNase A digestion after denaturing any remaining hybrids. In this case, if a mismatch is detected and probe destroyed by RNase A, the complements on the array will not anneal with the degraded

15 RNA under stringent conditions. In a similar fashion, DNA probes can be used to detect mismatches, through enzymatic or chemical cleavage. See, e.g., Cotton, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397 (1988); Shenk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:989 (1975); and Novack et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:586 (1986). Mismatches can also be detected by shifts in the electrophoretic ability of mismatched duplexes relative to matched duplexes. (See, e.g., Cariello, *Human Genetics* 42:726 (1988), herein incorporated by reference).

20 With any of the techniques described above, the mRNA or DNA from a tested organism that corresponds to regions of an IRP-2 having a polymorphism can be amplified by PCR before hybridization.

The presence of an IRP-2 polymorphism or wild type sequence in a protein sample can also be detected by using conventional assays. For example, antibodies immunoreactive with an IRP-2 polymorphism can be used to screen biological samples for the predilection of a neurodegenerative disease (e.g.,

25 Alzheimer's disease). Additionally, antibodies that differentiate the wild type IRP-2 from mutant IRP-2 can be used to determine that an organism does not have a predilection of a neurodegenerative disease (e.g., Alzheimer's disease). In preferred embodiments, antibodies are used to immunoprecipitate the wildtype or mutant forms of IRP-2 from solution or are used to react with the wild type or mutant IRP-2 on Western or immunoblots. Favored diagnostic embodiments also include enzyme-linked immunosorbant assays (ELISA),

30 radioimmunoassays (RIA), immunoradiometric assays (IRMA) and immunoenzymatic assays (IEMA), including sandwich assays using monoclonal and/or polyclonal antibodies. Exemplary sandwich assays are described by David et al., in U.S. Patent Nos. 4,376,110 and 4,486,530, hereby incorporated by reference. Other embodiments employ aspects of the immune-strip technology disclosed in U.S. Patent Nos. 5,290,678; 5,604,105; 5,710,008; 5,744,358; and 5,747,274, herein expressly incorporated by reference in their

35 entireties.

In another preferred protein-based diagnostic, antibodies of the invention are attached to a support in an ordered array wherein a plurality of antibodies are attached to distinct regions of the support that do not

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 32 -

overlap with each other. As with the nucleic acid-based arrays, the protein-based arrays are ordered arrays that are designed to be "addressable" such that the distinct locations are recorded and can be accessed as part of an assay procedure. These probes are joined to a support in different known locations. The knowledge of the precise location of each probe makes these "addressable" arrays particularly useful in binding assays. For example, an addressable array can comprise a support having several regions to which are joined a plurality of antibody probes that specifically recognize a particular IRP-2 protein and differentiate the mutant and wild type IRP-2 proteins.

Accordingly, proteins are obtained from biological samples and are labeled by conventional approaches (e.g., radioactivity, colorimetrically, or fluorescently). The labeled samples are then applied to the array under conditions that permit binding. If a protein in the sample binds to an antibody probe on the array, then a signal will be detected at a position on the support that corresponds to the location of the antibody-protein complex. Since the identity of each labeled sample is known and the region of the support on which the labeled sample was applied is known, an identification of the presence, concentration, and/or expression level can be rapidly determined. That is, by employing labeled standards of a known concentration of mutant or wild-type IRP-2 protein, an investigator can accurately determine the protein concentration of the particular IRP-2 protein in a tested sample and can also assess the expression level of the specific form of IRP-2 protein. Conventional methods in densitometry can also be used to more accurately determine the concentration or expression level of the specific IRP-2 protein. These approaches are easily automated using technology known to those of skill in the art of high throughput diagnostic analysis.

In another embodiment, an opposite approach to that presented above can be employed. Proteins present in biological samples can be disposed on a support so as to create an addressable array. Preferably, the protein samples are disposed on the support at known positions that do not overlap. The presence of a protein encoding a mutant or wild-type IRP-2 protein in each sample is then determined by applying labeled antibody probes that recognize epitopes specific for the mutant or wild-type form of IRP-2 protein. Because the identity of the biological sample and its position on the array is known, an identification of the presence, concentration, and/or expression level of a particular polymorphism can be rapidly determined.

That is, by employing labeled standards of a known concentration of mutant and/or wild-type IRP-2 protein, an investigator can accurately determine the concentration of IRP-2 protein in a sample and from this information can assess the expression level of the particular form of IRP-2 protein. Conventional methods in densitometry can also be used to more accurately determine the concentration or expression level of the IRP-2 protein. These approaches are also easily automated using technology known to those of skill in the art of high throughput diagnostic analysis. As detailed above, any addressable array technology known in the art can be employed with this aspect of the invention and display the protein arrays on the chips in an attempt to maximize antibody binding patterns and diagnostic information.

In another diagnostic embodiment, the immune-strip technology disclosed in U.S. Patent Nos. 5,290,678; 5,604,105; 5,710,008; 5,744,358; and 5,747,274, herein expressly incorporated by reference in their entireties, is adapted to present an antigen that is recognized by antibodies to wild type or mutant IRP-2

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 33 -

protein. These antigen presenting immunostrips are then used to analyze biological samples for the presence of antibodies to the various forms of IRP-2 protein. Although wild type or mutant IRP-2 peptides or protein are the preferred antigen for these embodiments, peptidomimetics that resemble these molecules can be used. These peptidomimetic-based embodiments can be more protease resistant and may be stripped and used for many applications. Preferably, peptidomimetic-based IRP-2 arrays are created (e.g., genechips having a peptidomimetic resembling wild type and mutant IRP-2 protein) and used to screen large panels of biological samples.

In another preferred approach, blood samples from subjects suspected as being at risk for a neurodegenerative disease are obtained and analyzed by flow cytometry (FACS) using antibodies directed to epitopes on the wild type IRP-2 protein and/or mutant forms of IRP-2 protein. Standard flow cytometric techniques using fluorescently labeled secondary antibodies (e.g., fluorescein conjugated goat anti-human IgG) and commercially available cell fixation and permeabilization kits (PermaCyte-FP) will be used. Accordingly, resuspended cells are reacted with the anti-IRP-2 antibody and the secondary antibody and the immune complexes are passed before the FACS. Cells will be monitored for the distribution and quantitation of fluorescence. By using antibodies specific for wildtype and/or mutant IRP-2 proteins, a determination of the presence and amount of various forms of IRP-2 proteins can be rapidly determined.

As discussed above, the presence or detection of a polymorphism in an IRP-2 molecule can provide a diagnosis of a neurodegenerative disease (e.g., Alzheimer's disease). Additional embodiments include the preparation of diagnostic kits comprising detection components, such as antibodies, specific for a particular polymorphic variant of IRP-2. The detection component will typically be supplied in combination with one or more of the following reagents. A support capable of absorbing or otherwise binding RNA or protein will often be supplied. Available supports for this purpose include, but are not limited to, membranes of nitrocellulose, nylon or derivatized nylon that can be characterized by bearing an array of positively charged substituents, and Genechips™ or their equivalents. One or more enzymes, such as Reverse Transcriptase and/or Taq polymerase, can be furnished in the kit, as can dNTPs, buffers, or non-human polynucleotides like calf-thymus or salmon-sperm DNA. Results from the kit assays can be interpreted by a healthcare provider or a diagnostic laboratory. Alternatively, diagnostic kits are manufactured and sold to private individuals for self-diagnosis.

In addition to diagnosing disease according to the presence or absence of a polymorphism in an IRP-2 DNA, mRNA, or protein, some neurodegenerative diseases involving defects in oxidation, ubiquitination, and proteasome degradation of IRP-2 result from skewed levels of mutant and wildtype IRP-2. By monitoring the level of expression of specific forms of IRP-2, for example, a diagnosis can be made or a disease state can be identified. That is, many neurodegenerative diseases result from a dosage effect, wherein an overabundance of a mutant IRP-2 that is unable to undergo oxidation persists. Thus, by determining ratios of the level of expression of various IRP-2 (e.g., patterns of IRP-2 expression) a prognosis of health or disease can be made.

Accordingly, the levels of IRP-2 expression in various samples from healthy individuals, as well as, individuals suffering from a neurodegenerative disease is determined. These values can be recorded in a

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 34 -

database and can be compared to values obtained from tested individuals. Additionally, the ratios or patterns of IRP-2 expression in various samples from both healthy and diseased individuals are recorded in a database. These analyses are referred to as "disease state profiles" and by comparing one disease state profile (e.g. from a healthy or diseased individual) to a disease state profile from a tested individual, a clinician can rapidly diagnose the presence or absence of disease. Databases having measurements of IRP-2 expression of several individuals afflicted with a neurodegenerative disease are valuable standards by which the progression of disease can be monitored. In this manner, deviation between the standard and the organism values establishes the severity of disease state.

The nucleic acid and protein-based diagnostic techniques described above can be used to detect the level or amount or ratio of expression of a IRP-2 RNAs or proteins in a tissue. Through quantitative Northern hybridizations, *in situ* analysis, immunohistochemistry, ELISA, genechip array technology, PCR, and Western blots, for example, the amount or level of expression of RNA or protein for a particular IRP-2 (wild-type or mutant) can be rapidly determined and from this information ratios of expression can be ascertained. One diagnostic approach, for example, involves a method of correlating the ratio between the expression levels of a plurality of IRP-2 isoforms with a disease state. To practice this method, biological samples from individuals suffering from a neurodegenerative disease and biological samples from normal individuals are obtained. Next, the expression levels of two or more IRP-2 proteins or nucleic acids encoding IRP-2 proteins (e.g., a wild type and a mutant form of IRP-2) in the samples is determined and an analysis as to whether there is a statistically significant association between the ratio of wild type and mutant IRP-2 expression and the neurodegenerative disease is made. Statistically significant associations can be determined using statistical methods familiar to those skilled in the art, including t test and chi-square analyses.

Once the levels of various IRP-2 molecules are determined, the information can be recorded onto a computer readable media, such as a hard drive, floppy disk, DVD drive, zip drive, etc. After recording and the generation of a database comprising the levels of expression of the various IRP-2 molecules studied, a comparing program is used which compares the levels of expression of the various IRP-2 molecules so as to create a ratio of expression. In a first comparison, for example, a wild type IRP-2 to a mutant IRP-2 ratio is generated. Additionally, desirable comparisons can include, but are not limited to, the various mutant forms of IRP-2 with each other and/or wild type IRP-2. The examples describe the preparation of antibodies specific for oxidized and reduced wild type and mutant forms of IRP-2. Another aspect of the invention relates to a method for using magnetic resonance imaging (MRI) to measure and/or monitor brain iron in its various *in vivo* states (non-transferrin bound iron (NTBI), transferrin bound iron (TBI), and high molecular weight complexes, including ferritin and hemosiderin). The integration of high resolution 3D gradient echo imaging, phase imaging (SWI) with removal of background field effects, understanding T2\* signal losses, and the extraction of susceptibility using a special spin echo/gradient echo imaging method leads to absolute quantification of brain iron.

**A. high resolution 3D, gradient echo imaging**

Obtaining a sensitivity to small local field susceptibility effects requires imaging with long echo times. Background field effects caused by air/tissue interfaces lead to dramatic signal losses in tissues adjacent to

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 35 -

these areas for long echo times. Dephasing across a voxel, as previously shown, can be reduced by using very small voxels so that phase variation from background (or other) fields is reduced to less than  $2\pi$ . This maneuver leads to a dramatic recovery of signal and, when the images are filtered, to recover the lost signal-to-noise going to higher resolution. These results are different than what would have been obtained with lower resolution. This method is referred to as the commutator effect, i.e., a special non-linearity inherent in the MR acquisition methods. Phase images from echo times as long as 120 ms at 1.5T have been shown to represent a means to visualize susceptibility differences between tissues. Venous structures, gray matter/white matter susceptibility differences and iron in the basal ganglia become visible with this modification.

#### *B. phase imaging and removing background field effects*

The use of phase images is a natural way to begin evaluating the presence of paramagnetic (or diamagnetic) differences between tissues in the brain. The phase in an MR image is given by  $\phi = \gamma \Delta B t$  where  $\gamma$  is the gyromagnetic ratio,  $\Delta B$  the change in magnetic field from one tissue to the next, and  $t$  the time at which the data are measured (usually the echo time TE).

The problem with visualizing these differences arises from the extra phase effects from background field effects from air/tissue interfaces. A high pass phase filter was developed to remove the background field effects that are predominantly low spatial frequency. Phase images dramatically improved with this processing technique. This method has been successfully used to map oxygen saturation in the brain and even small changes in oxygen saturation during functional brain activation (that is, we could easily measure changes as small as 0.03 ppm with an error of 0.002 for the particular 3D sequence used for those experiments). This implies that, for a p value of 0.025, it is asserted that susceptibility differences as small as 0.004 are measurable with this sequence (The sequence used was a 5 minute, 3D gradient echo method with a TE = 40ms and a resolution of  $0.5 \times 1.0 \times 2.0$  mm<sup>3</sup>). Sensitivity can be improved by collecting the data a second time and averaging it, or averaging multiple acquisitions as well as filtering the data to a lower resolution.

Another approach to remove all linear phase effects is to use a double echo method. The phase from the first echo is used to predict the phase from the second echo based upon the simple linear dependence of phase expected from background phase effects. When the phase of the first echo,  $\gamma \Delta B T E_1$ , is multiplied by  $T E_2 / T E_1$  to predict  $\gamma \Delta B T E_2$ , and the predicted phase subtracted from that of the second echo (accomplished by complex division), the expected phase of the corrected image is zero and leaves behind any non-linear effects associated with a two-compartment model where the phase effects are not simply additive. This approach makes it possible to separate small local pixel effects.

#### *C. understanding T2\* signal losses*

Recently, analytical evaluation of the signal loss in a spherical voxel caused by a dipole field the source of which was a small volume enclosed within the voxel has been performed. Long echo times can induce significant oscillations in the signal behavior (i.e., signal changes that are non-exponential in nature).



WO 02/12284

- 36 -

PCT/US01/24747

In an attempt to quantify signal losses in T2\* weighted imaging, a theory was developed that allows prediction of signal behavior in the presence of small randomly distributed local sources of susceptibility change. Specifically, signal change is not exponential in nature near the time origin and is in the intermediate (and long) time domains. The theory can be used to extract the volume susceptibility of the random sources as well as their volume fraction within a voxel. The exact quantitative nature of this method has not been  
 5 validated for a set of random structures *in vivo*.

The dependence of T1 relaxation in the brain was studied and revealed that frontal areas in the brain have the longest T1 for gray matter while areas near the motor cortex have the smallest T1 values. A loss of contrast with gray matter and white matter in this region results. Phase measurements of the same regions  
 10 reveal a strong correlation between phase and iron content, showing the largest in the motor cortex. The present invention involves correlation between the phase and iron content in the brain as a function of age.

#### ***D. extraction of susceptibility using a special spin echo/gradient echo imaging method***

In order to account for background field inhomogeneities across a slice or voxel not caused by  
 15 microscopic effects, and to eliminate any dependence on the rf pulse design as well, a special combined gradient echo and spin echo acquisition method was defined. A series of gradient echoes are collected around the spin echo and used to remove background field effects as follows. The last gradient echo is divided by the first gradient echo image to create the equivalent of a T2 weighted image without dephasing across the voxel. Once T2 is known, the effect of T2 on the multiple gradient echoes is removed so that only  
 20 the pristine changes due to T2\* (those signal changes caused by the local sources of susceptibility) remain. The signal dependence can be shown to have a quadratic behavior in time and, when fit, both the magnetic moment and volume content of the sources can be extracted quantitatively.

In a preferred embodiment of the invention, MR imaging will be done at 1.5T and 4.7T to study humans and animals. Susceptibility differences as small as 0.004 ppm can be measured with a 3D gradient  
 25 echo method with a TE = 40ms and a resolution of 0.5 x 1.0 x 2.0 mm<sup>3</sup> (requiring a 5 minute scan time). By going to 4.7T and using a small mouse brain surface coil, a factor of roughly 8 in SNR is gained and reduced the voxel size to 0.5 mm x 0.5mm x 0.5mm. If data is collected for 40 minutes, the voxel size can be reduced to 0.25 mm x 0.25mm x 0.25mm which is not critical to the success of this project, but provides benefits in differentiating structures in the mouse brain.

30 Another preferred embodiment involves magnetic image (MRI) analysis of material referred to as phantoms with a known susceptibility to validate the ability of MRI to correctly quantify iron content with a given geometry. Three different shapes are considered: first, a simple test tube is imaged both parallel and perpendicular to the main field; second, a thin plane is imaged; and third a thin plane warped to represent  
 35 more the folds in the brain parenchyma is imaged. These planes are created using mylar film to separate layers 2 to 3mm thick to mimic the human brain. The dimensions of these phantoms are on the order of 10 cm on each side again to mimic the human brain and also to allow proper tuning and shimming of the phantoms. An agarose gel is used as the filling material doped with several different iron carrying compounds with a

WO 02/12284

- 37 -

PCT/US01/24747

series of different concentrations (first 100 nmol/gm and then 4 more times starting at 500 nmol/gm at increments of 500 nmol/gm up to 2000 nmol/gm) to mimic the iron in the brain. The susceptibility of each compound is measured using the test tube shape since the effect of the geometry on phase under these conditions is well understood. Specifically, four different types of phantoms composed of a) FeCl<sub>3</sub>, b) FeSO<sub>4</sub>, c) ferritin, and d) hemosiderin are prepared. The phantom experiments allow study of the effect of concentration of iron for random systems (low concentrations are expected to have an exponential effect on signal loss while high concentrations are expected to be more geometry dependent). However, the structure and iron concentration of the brain do not appear to have the usual geometry effect as the sulci phase and is found to be rather uniform, independent of the folding that occurs. This may indicate a low concentration and, hence, an easy means to calibrate the phase independent of object shape. These experiments are carried out at both 1.5T and 4.7T to ensure that the linear behavior is present and that there are no special calibrations required from one field strength to the next. Accordingly, imaging of phantoms allows correlation of the susceptibility measurements from the MR images to the known iron concentration within each of the phantoms. Phantoms of different shapes and with different concentrations of various iron molecules can be tested. Using the phantoms, sequence optimization is performed at both 1.5T for humans and 4.7T for animals prior to implementation. The present invention involves a method of iron quantification for use on animals and humans and for monitoring iron changes over time in the Alzheimer's brain.

Another preferred embodiment involves magnetic resonance image analysis of transgenic mice that accumulate brain iron and sustain a neurodegenerative disease for validation of the MRI technique. Transgenic mice engineered with a deletion encoding the iron regulatory protein-2 (IRP2) are known to accumulate significant levels of neuronal iron (La Vaute 2001). The transgenic mice have onset of neurodegenerative symptoms within 6 months of age that is typically manifest as ataxia, vestibular dysfunction tremors and postural abnormalities among others (La Vaute 2001). Preferably, mice are kept on a twelve-hour light-dark schedule with free access to commercial pellet chow and water. Further, mice are observed for skin, oral mucosal, behavioral and neurologic signs, and weighed weekly. Animals showing abnormal behaviors are to be euthanized. At selected intervals, animals are anesthetized for neuro-imaging by isoflurane inhalation (4% induction, 1% maintenance) and then placed into an MRI compatible stereotactic apparatus. Rectal temperature is monitored continuously and maintained at  $37 \pm 0.5$  °C with a warm water coil placed under the animal.

In order to precisely correlate the novel imaging findings using the optimized MRI sequences, four groups of mice are imaged. The present invention involves the monitoring of iron regulated proteins, including IRP-2, both by quantity and localization in mouse brain tissue. The groups will be a) controls (C57bl/6), b) Irb2<sup>+/+</sup>, c) Irb2<sup>+/+</sup>, and d) Irb2<sup>-/-</sup> mice. The groups will provide a comprehensive overview of the effect of the accumulation of iron (and its various forms) within the brain. Previous work has demonstrated that these mice progressively increase brain iron content up to 18 months of age. Using the optimized sequences developed, mice are imaged consecutively at 1, 3, 6, 9, 12 and 18 months to understand the spatial and temporal deposition of iron within the brain. The initial imaging group is sufficiently large to allow extraction of

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 38 -

6 animals at each time point for quantitative histochemistry which allows absolute verification of the various forms of iron within the brain (and other tissues), correlates the imaging data with the actual levels of iron and correlates the regional levels of iron and the imaging data which provides definitive insights into the basis for degenerative diseases.

5 Prior to imaging, mice are anesthetized with isoflurane to a sufficient level to prevent movement artifacts on MR images. Imaging is performed on a Bruker Avance 4.7T imager with a head only volume coil. After homogenizing the magnetic field, a spin echo T1-weighted scout is obtained with a relaxation time (TR) of 700 ms and an echo time (TE) of 20 ms with 2 acquisitions and 3 slices in the coronal, sagittal and transverse directions. Ten slices, each 2 mm thick with a 2 mm separation is positioned at the level of the  
10 hippocampus (~4 mm posterior to bregma) and piriform cortex (at the level of bregma) on the scout images. Spin echo diffusion weighted and multi-echo T2-weighted data sets are collected. The parameters used for the diffusion-weighted sequences are 2200/100 ms (TR/TE) for coronal slices with 2 acquisitions with a 45 mm field of view (FOV) and a 128x128 matrix. The diffusion gradients are applied in the z direction. A b value of 1000 s/mm<sup>2</sup> is used to compute the apparent diffusion coefficient (ADC) maps. Multi-echo T2-  
15 weighted sequence parameters consisted of 3000/40 ms (TR/TE) and 6 echos each 40 ms apart, with one acquisition for 3-5 slices.

The ADC map is determined by the equation:  $ADC = \ln(S_0/S_n)/b$  where  $S_n$  is the mean intensity for a DW image and  $S_0$  is the mean intensity for the corresponding diffusion unweighted image (8032). ADCs are calculated for each pixel in the map. High ADC values are represented as bright on DW maps. ADCs for  
20 regions of interest (ROI) are calculated as the mean of the ADC for all pixels in the specified area. T2 maps are generated from 6 echo T2 sequences. T2 relaxation constants are then calculated for each pixel using nonlinear least squares curve fit to the data using the equation:  $M(t) = M_0(1 - e^{-t/T_2})$  where  $M_0$  is the initial magnetization value before decay,  $t$  is the echo time (ms) and  $T_2$  is the spin-spin relaxation time.

Another preferred embodiment concerns image analysis performed for each mice on a single slice  
25 immediately anterior to the slice where the hippocampus can be seen curling inferiorly. This position corresponded approximately to bregma -3.60 mm and maximized the cross-sectional area of each region of interest (ROI). Cheshire™ image processing software (Hayden Image Processing Group, Waltham, MA) is used to outline and analyze the ROI's that are confirmed by a second researcher. The bilateral ROI's included the amygdala (and associated nuclei), piriform cortex (including part of the entorhinal and perirhinal  
30 cortices), hippocampus, retrosplenial cortex (including motor and somatosensory cortices) and thalamus. A two pixel width separates the hippocampi and retrosplenial ROI's. A line is drawn across the bottom of both hippocampi that extends across the cortex demarcated the inferior border of the retrosplenial ROI. The piriform and amygdala ROI's are abutted each other and extended the same distance superiorly and inferiorly. Medially two to four pixels separate the thalamus from the amygdaloid ROI, to minimize signal contribution  
35 from the lateral ventricle. A 5 by 5 pixel square is centered within the thalamus. For the 3D gradient echo images, information from slices around this slice is evaluated.

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 39 -

Although the ability to extract iron from phantom data is promising, iron quantitation in the animal (and human) brain are confounded by innate ambiguities. For a chemical differentiation of iron types, the relative susceptibilities as seen by MRI between tissues and iron in ferritin, macrophages and free iron around beta-amyloid plaques are attempted. The brain iron are quantified using phase and T2\* imaging and compared to that found histo-chemically in the mouse brain. It is well known that there is iron in and around the blood vessels near the plaque. The MR images are correlated with the brain iron changes in the mouse model, and provide the potential to detect early plaque formation.

In another embodiment of the invention, upon completion of MRI analysis, four mice are euthanized for brain and blood tissue harvest, storage and processing for use in immuno-histochemistry and iron chemistry that complement the MRI studies and in combination allow understanding of the role of IRP-2 in brain iron metabolism. The blood and brain tissue are removed from the mice after CO<sub>2</sub> asphyxiation. The blood is pooled per group and processed to isolate leukocytes and to obtain a serum sample archived frozen at -70°C. The brains are separated into right and left hemispheres, weights recorded by wet weight, and randomly, one hemi-brain from each animal is placed in plp (4% buffered formalin solution) and the other half placed in cryoprotectant and frozen. The frozen brain tissue is sectioned and every third section from the front (level 1), middle (level 2), and the back (level 3) is placed on poly-L-lysine coated slides. Cerebral cortex, lateral ventricles, corpus callosum and caudate putamen are present in level 1 sections, cerebral cortex, thalamus, third ventricle and hippocampus are present in level 2 sections, and cerebellum, medulla, fourth ventricle and pyramidal tracts are present in level 3 sections. Thirty-three 5 to 10  $\mu$ m sections are made from each half-brain (in triplicate: 1 set for H&E, 1 set for apoptosis, 1 set for prussian blue staining for ferric iron distribution, and 7 sets for immunocytochemistry using anti-IRP-1, anti-IRP-2, anti-ferritin, anti-transferrin receptor,  $\beta$ -amyloid ubiquitin and hemosiderin). Three additional 30  $\mu$ m sections (1 from each brain level) are weighed (wet weight) and placed into evacuated freezer bags for processing elemental iron content.

For H&E and apoptosis measurements of the mice tissues, one 5-10  $\mu$ m-tissue section from each of the three brain levels is stained with H&E for morphologic assessment of the tissue. One set of each brain tissue sections is labeled using an Apodirect assay modified as described by Green et al. 2001. DNA damage is used to assess late apoptotic events in the brain tissue using terminal deoxynucleotidyl-transferase (TdT) mediated fluorescent (FITC)-conjugated BrdU incorporation into free 3' ends of nucleic acids. Briefly, tissue is fixed in -20°C 70% ethanol for 15 minutes. The fixed tissue is re-hydrated in PBS for five minutes and incubated with a mixture of TdT, reaction buffer and FITC-BrdU provided with the kit. Tissue is incubated with the DNA labeling mixture overnight at room temperature (22-24°C), washed and counter-stained for 30 minutes with propidium iodide (PI)/RNAse, washed and protected with permafluor and covered with glass coverslips. FITC-BrdU incorporation is quantified using a laser scanning cytometer (LSC) (CompuCyle, Cambridge, MA) as described below.

For immunocytochemical labeling of frozen tissue sections of the mice, tissue is fixed as described above for the apoptosis assay (Green et al. 1995; Green et al. 2001). The fixed tissue is labeled with primary antibodies (anti-Irp-1, anti-Irp-2, anti-ferritin, anti-transferrin/transferrin receptor,  $\beta$ -amyloid ubiquitin and

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 40 -

hemosiderin). Incubation with primary antibodies/antisera is 16 hrs at 4°C, followed by washing in PBS containing 0.05% Tween-20 (PBST). Antibodies that are not directly conjugated to a fluorescent molecule are secondarily labeled with alexa-488, alexa-594, Cy-2 or Cy-5 anti-mouse or rabbit IgG antibodies for a minimum incubation period of 4 hrs at 25°C. Just prior to completion of the secondary antibody incubation, DAPI (1µg/ml) or propidium iodide (PI, 5µg/ml), depending on the ability to dual label and/or confocal microscopy as the analytical endpoint, is added for 10 min. Excess secondary antibody and nuclear counterstain is removed by washing in PBST, and the tissue is protected with permafluor and glass coverslips and is dried flat in the dark prior to quantitative analysis (LSC and Confocal microscopy as described below) and photography. Non-specific fluorescence is determined by incubating control sections with non-immune sera and secondary antibody, or secondary antibody alone.

For quantification of specific proteins, including IRP-2, in the mice tissues, Laser Scanning Cytometric (LSC) is performed on fluorescently-labeled mice tissues. The LSC has an Olympus BX50 base and is configured with argon ion, helium-neon and UV lasers for 6-color analysis. There are four sensors, simultaneously digitized at 625,000 Hz corresponding nominally to 0.5-micrometer spatial intervals along the scan. Fluorescent energy is collected by the objective, reflected by a partially silvered mirror to allow the CCD camera to image the cells and steered through a scan lens to the scanning mirror. Dichroic mirrors and optical interference filters are supported by 4 photo-multiplier tubes, each capable of detecting a specific range of fluorescent wavelengths. The fluorescent measurements and x, y coordinates are recorded digitally and stored as FCS files in the computer base. Tissue to be analyzed is contoured by the labeled nucleus. A variety of gating parameters can be chosen, but includes those that collect information on signal intensity versus cell size, cell number (area, perimeter, count, etc). Protocol settings and display parameters are optimized using control positive and negative samples, the optimized protocol and display files are stored and utilized in scanning replicate sections.

For localization of the specific proteins quantitated by the LSC, confocal microscopy is performed on the mice tissues. Many proteins have discrete locations that coincide with their functional properties, and thus, a better understanding is gained by the cellular/subcellular localization of specific proteins by confocal microscopy (Altura et al. 2001). Fluorescently labeled tissue sections are imaged in 3-dimension using an Olympus IX-70 based, BioRad-1024 confocal microscope. Sections are acquired with low power (4-20x) in 0.5µm z-steps for general distribution, and high power (40-100x) magnification for acquiring cellular/subcellular location of the proteins listed above.

For iron quantification of mice tissues, iron distribution is estimated by, Prussian blue staining (ferric) and total iron by atomic spectroscopy. Prussian blue staining is performed on paraffin embedded sections using a sensitive modification of the standard method (Moos & Mollgard, 1993) which involves mixing potassium ferrocyanide (2.5%) with HCL acid (2.5%) for 20 minutes at room temperature, rinsed with hydrogen peroxide and cell nuclei counterstained with PI.

For statistical analysis of the MR imaging data, left and right comparison of the bilateral region of interests (ROI) will be performed for each animal using a one way ANOVA ( $p < 0.05$ ). A two-tailed student's t-

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 41 -

test (significant at  $p < 0.05$ , highly significant at  $p < 0.01$ ) will then be performed to compare the control values with the experimental values at each time point.

To extract relative iron content from the MR imaging data, the present invention involves an imaging method that uses a high resolution 3D gradient echo sequence. Most susceptibility features to be studied are best imaged when the resolution is a factor of one to two times the size of the object. For this reason, in the human brain, the following parameters: TR = 67ms, TE = 40ms, resolution of  $0.5 \times 1.0 \times 2.0 \text{ mm}^3$  with a scan time of 5 minutes were used. Small structures like venules on the order of 300 to 500 microns and small iron deposits less than  $1 \text{ mm}^3$  in size in the basal ganglia are visible in the image because of their signal cancellation properties and their phase effects in the image. This exquisite sensitivity to micro-voxel effects makes SWI so powerful. As mentioned above, for a 40 minute scan, a resolution of  $0.25 \times 0.25 \times 0.25 \text{ mm}^3$  can be collected in the mouse brain.

In another embodiment of the invention, for a random system, voxel size is less important and then larger voxels can be used for faster imaging and better SNR. The gradient echo sequence is tested on the phantoms mentioned above to measure the phase as a function of iron concentration and as a function of resolution to ensure scale invariance of the measurement.

Since current iron concentration differences between gray matter and white matter are manifest as roughly 20 degrees in 40 ms which corresponds to roughly 0.1 ppm, error analysis of phase in phantoms, animals and humans was applied. If the SNR in the magnitude image is only 15:1 then the standard deviation of the phase is 0.06 radians ( $4^\circ$  or 0.002 ppm) or roughly a ten percent error. One could then imagine evaluating susceptibility differences greater than 3 standard deviations which corresponds to 0.006 ppm with a p value of 0.005. Improvement of data by averaging can be accomplished in two ways. First, more data is acquired or the data is filtered, depending on the resolution required. For example, if a lower resolution is sufficient, then the SNR can be dramatically improved per unit time by running the experiment with lower resolution to enhance the SNR. For example, an MR scan with the resolution of  $0.5 \times 1.0 \times 2.0 \text{ mm}^3$  and a TE = 40ms takes 5 minutes to acquire and yields the values quoted above. However, if a resolution of  $1 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  is sufficient, then the scan takes half the time and yields 2 times higher SNR. So if the same 5 minutes were used, the increase in SNR is  $2\sqrt{2}$  tantamount to imaging at a field strength 8 times higher. Resolutions may vary from 0.25 microns to 1 mm in the phantoms and animals.

For human studies, several sets of imaging parameters on the first 5 normals and 5 age matched Alzheimer's patients are used. Echo times of 40, 80 and 120 ms in order to evaluate the *in vivo* sensitivities are included. The resolution may vary from  $0.5 \times 0.5 \times 1.0 \text{ mm}^3$  to  $1 \times 1 \times 2 \text{ mm}^3$  in order to study the sensitivity as a function of voxel size. On the higher resolution images, the data will be filtered to a lower resolution image by a factor of two in each direction to compare with the lower resolution data. Reasons for this method include the fact that Gibbs ringing is reduced relative to the lower resolution scan, the effects of field inhomogeneities are reduced, and scale invariance effects can be checked.

An absolute iron content can be extracted from the MR imaging data. A linear increase in T2' measurements is predicted as iron concentration increases. A multi-echo, gradient/spin echo combination

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 42 -

defined as follows is used. A spin echo structure with a TE of 80ms is created. About this echo time, a series of 31 echoes of the same polarity (an echo every 2.5ms) is collected. The following theory (see ref xx, xy and xz for more details) has been theoretically predicted and experimentally verified. The signal behavior for a random set of spheres (which is an excellent approximation for iron known to conglomerate in spherical shapes) especially given the large voxels we are using) is given by:

$$S(t) = p(1 - \lambda) \exp(-0.4(t/\delta\omega)^2) \quad \text{for } t/\delta\omega < 1.5$$

and

$$S(t) = p(1 - \lambda) \exp(-it\Delta\omega) \exp(-R2' \text{abs}(t - t_0)) \quad \text{for } t/\delta\omega > 1.5$$

where

$$\delta\omega = \gamma 4\pi(M-M_0)/3, R2' = 1.21 \lambda \delta\omega, t_0 = 1/(1.21 \delta\omega) \text{ and } \Delta\omega = -0.16 \lambda \delta\omega.$$

By measuring the short time and long time components, a numerical estimate for the arguments in each exponential and, therefore, for  $(M-M_0)$  (extracted from  $\delta\omega$ ) and for  $\lambda$  (extracted from  $R2'$  since  $\delta\omega$  is now known) is obtained. For example, for magnetic particulates used as contrast agents in MRI, such as AMI 225,  $\delta\omega$  has the value  $3.4 \times 10^{-7}$  /s. Using a volume fraction of  $\lambda = 2 \times 10^{-6}$  yields an  $R2'$  of 82.23/s in excellent agreement with other estimates (which range from 80 to 100/s from numerical simulations). When the susceptibility is known,  $R2'$  can be used directly as a measure of the volume fraction  $\lambda$ . For much smaller susceptibilities on the order of ppm, such as diamagnetic or paramagnetic substances,  $\delta\omega$  is on the order of ms. For example, for a vein with haematocrit of 0.4 and oxygen saturation of 55%, the value of  $\delta\omega$  is about 3 ms. Ironically, the smaller the susceptibility, the longer  $\delta\omega$  and when  $t_0$  lies between 3 and 30 ms after or before the spin echo, the signal can now be used to find the susceptibility of the source producing the signal loss as well as its volume content. Because the susceptibilities of each of the components found to be responsible for the signal loss (ferritin, etc.) are measured, this feature is not used. However, another numerical estimate can be made for the phase term  $-0.16 \lambda \delta\omega$  which is directly related to  $R2'$ . This estimate adds no new information when there is only one source of magnetic field variation. However, if non-heme iron is not the only source and heme iron contributes through the vein mechanism referred to above, then these two may no longer be related and temporal response measured about the echo will be a parabola. From this, a two parameter model can be used to extract the heme from non-heme iron. Finally, as a means to accomplish this unambiguously, a contrast agent is used to modify the local susceptibility in a known way and repeat the experiment.

The above results are compared with T1, T2 and diffusion weighted imaging to touch base with previous measurements in the field. The multi-echo, spin echo sequence described in the animal model

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 43 -

section is to measure T1. A 3D variable angle method and a conventional 2D multiple IR sequence are used to estimate T1 values.

A complete error analysis is performed for each of the four measurements: phase, R2', R2 and R1. Discrepancies between the methods are noted. Signal recovery can occur in a number of instances which ruin the correlation with iron for R1 and R2 methods but does not affect phase or R2'.

Another simple approach to remove all linear phase effects is to use a double echo method. The phase from the first echo is used to predict the phase from the second echo based upon the simple linear dependence of phase expected from background phase effects. If the phase of the first echo,  $\gamma\Delta BTE1$ , is multiplied by  $TE2/TE1$  to predict  $\gamma\Delta BTE2$ , and the predicted phase subtracted from that of the second echo (usually accomplished by complex division) then the expected phase of the corrected image will be zero. This eliminates any non-linear effects associated with a two compartment model where the phase effects are not simply additive and enables separation of small local within pixel effects.

The phase expected from heme and non-heme sources using the known estimates for the susceptibility of ferritin and its concentration of 1450nmol/gm taken from the red nucleus is estimated using a multi-echo spatial technique to quantify the heme component. The heme iron reveals itself as an oscillatory effect for blood but not for free iron or iron in ferritin. This technique is sensitive to partial volume effects coming from venous blood and should be distinct from the effects caused by a uniform distribution of iron in the brain parenchyma. The same sequence is performed with a blood nulling technique. The amount of phase behavior that comes from heme iron (if any) versus free iron or iron bound in ferritin is quantified. The effects of blood may be determined by using a known quantity of contrast agent (the conventional agents have a phase effect of 1°/mM/ms) to mimic the susceptibility of blood. By doubling the effect of blood, the effect of blood itself on the phase is estimated. To address the issue of resolution and scale dependence, the experiments can be performed at resolutions ranging from 0.5 to 2mm in humans and 0.25 to 1mm in animals to determine if there is any effect of voxel size on the measurements. Any changes to the phase of the image in the parenchyma or in the critical time  $t_c$  is a marker of the blood's contribution.

Study of the phase behavior and the ability of the phase filter to remove background material can be made. Since the filter used is a high pass filter, a loss of DC information results. As this is important to the quantification of the susceptibility (differences between tissues is not highly affected), the ability to extract the DC level phase is examined and compared with the original unfiltered data. To ensure an absolute measure of phase, not just phase differences, reference markers of known susceptibility are used. Imaging of both animals and humans is performed.

In the present invention, MR imaging is used to monitor patients. The MR imaging is sensitive to the early formation of beta-amyloid plaque and associated iron content in AD and degenerative effects in the later stages from plaque and from vascular changes and provides a means to quantify brain iron.

Another aspect of the invention concerns methods of early intervention and/or possible prevention of AD. Since subjects at risk for AD display mild cognitive impairment, including executive function and memory, for months to years prior to the aggressive and devastating expression of the disorder, longitudinal follow-up



WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 44 -

of AD cases with specific discriminating neuropsychological studies that increase diagnostic accuracy for AD, and detailed cognitive testing have proven useful.

Since mild cognitive disorder (MCI), a disorder of subthreshold dementia has been suggested to be linked with AD, a preferred embodiment of the invention concerns a target population of MCI patients. Subjects with this diagnosis perform 1.0 to 1.5 standard deviations below the reference standard for normals on standard neuropsychologic examinations and are not demented by standard tests. Guidelines and practice recommendations for the early detection of MCI in the elderly have recently been published (Jolles et al., *Drugs Aging*, 7(6):459-79 (1995)). Preferably, the invention involves a method of distinguishing between different cases of mild cognitive disorder (MCI). More preferably, the invention includes identification of cases of MCI that remain static from those cases of MCI that rapidly progress into dementia. Further, the invention includes a method that distinguishes between dementia syndrome and those disorders that are able to be surgically treated are developed. For example, methods for differentiating between MCI and normal pressure hydrocephalus that can be relieved by shunting procedures are developed. Further, methods for distinguishing between fronto-temporal atrophy and multi-infarct dementia disorders from AD are developed. Another preferred embodiment of the invention involves clinical monitoring of the course of dementia in MCI patients with screening instruments that include: Mini-Mental State examination, neuropsychologic tests, with supporting data from focused cognitive instruments and information.

Another preferred embodiment involves correlation between brain disorders and iron metabolism. Preferably, levels of brain iron quantitation through MRI technologies are correlated with the clinical course of dementia in patients. Further, levels of peripheral blood IRP-2 monitored through IRP-2 assays are correlated with the clinical course of dementia in patients. Patients with irregular levels of brain iron or peripheral IRP-2 are designated prime candidates for further study and for AD intervention and possible AD prevention.

100 individuals with MCI from a variety of sources are entered into the study. 50 individuals are entered in the first year and 50 individuals are entered in the second year. A referral service that encounters 6 to 8 new MCI patients per month will be the primary source of patients. A secondary source of patients includes local neurologists and psychiatrists that will be sent notices and public service messages placed on radio and television.

Subsequent to a telephone contact and a direct referral, the subject undergoes an extensive physical and neurological assessment to include psychometric studies to assess the level of impairment. These screening studies is as described by the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology.

The entry process consists of either a telephone interview with the study coordinator or direct referral. The first visit is an interview after selection on the basis of a mail-in questionnaire on dementia symptoms.

The guidelines of the Quality Standards Subcommittee is followed for subject selection. Criteria for entry into the study includes the following:

- 1) Age > 50 years
- 2) Education more than 7<sup>th</sup> grade

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 45 -

- 3) No history of a major neurological disorder: stroke, tumor, trauma, endocrinopathy, drug abuse, or psychiatric disorder.
- 4) No history of neurolytic drug maintenance
- 5) A score on the Mini-Mental State Examination  $\geq 10$
- 5 6) Able to give informed consent
- 7) An experienced conservator, family member

Each patient evaluation is completed in 2 weeks and consist of 3 sessions. Records are coded and standard information: psychometric scores, blood analysis results, MRI data will be abstracted into a special coding form. Data will be reviewed on a biweekly basis. All subjects give informed consent according to 10 guidelines approved by the Human Subjects Research Committee of Loma Linda University Medical Center and the NIH.

## EXAMPLE 1

## Preparation of Antibodies Specific for IRP-2 Peptides

Antibodies specific for oxidized and reduced forms of wild type and mutant IRP-2 peptides were 15 prepared as follows. Seven clones having one or more cysteine residues in the peptide loop of amino acid residues 138-216 of IRP-2 substituted with alanine were created by conventional techniques in molecular biology. The "C1A" clone has a substitution of the first cysteine proximal to the N-terminus with an alanine. (SEQ. ID. No. 4). The "C2A" clone has a substitution of the second cysteine proximal to the N-terminus with an alanine. (SEQ. ID. No. 6). The "C3A" clone has a substitution of the third cysteine proximal to the N-terminus with an alanine. (SEQ. ID. No. 8). The "C12A" clone has substitutions of the first and second 20 cysteines proximal to the N-terminus with an alanine. (SEQ. ID. No. 10). The "C23A" clone has substitutions of the second and third cysteines proximal to the N-terminus with an alanine. (SEQ. ID. No. 12). The "C13A" clone has substitutions of the first and third cysteines proximal to the N-terminus with an alanine. (SEQ. ID. No. 14). The "C123A" clone has substitutions of the first, second, and third cysteines proximal to the N-terminus with an alanine. (SEQ. ID. No. 16). A wild type peptide sequence was also produced recombinantly 25 in *E. Coli*. (SEQ. ID. No. 2).

Once the recombinant peptides were isolated, they were either oxidized or reduced. Oxidation of IRP-2 was performed at the concentration of 0.1:g/l protein in a 20:l reaction mixture (25mM Hepes-NaOH, pH 7.2 and 40mM KCl) in the presence of 50:M  $\text{FeCl}_3$  and 10mM DTT at 37°C for 15-30 minutes. The 30 reduced forms of the peptides were obtained by incubating the peptide in Tris-carboxyethyl-phosphine (TCEP) at 1mM for 15-30 minutes at 37°C. Once the oxidized and reduced peptides were obtained, they were coupled with KLH and were used to generate antibodies in mice. Hybridomas were made using conventional methods and the clones were screened for the production of antibodies specific for the particular peptide used to inoculate the mouse. The antibody generated to the wild type peptide was found to recognize both the 35 peptide of SEQ. ID. No 2 and full-length IRP-2 in both ELISA and Western blot. A 1:5000 dilution was found sufficient. Another selection process was also used to screen some of the antibodies. Because the oxidation of IRP-2 can depend on the conversion of a cysteine residue to aminomalonic acid, an IRP-2 peptide having

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 46 -

aminomalonic acid was synthesized. The clones were screened for reactivity to the aminomalonic acid peptide and also the native IRP-2 peptide. Clones that were reactive to the aminomalonic peptide but not the native peptide were selected. By using the teachings described in this example, antibodies to both mutant and wildtype IRP-2 proteins can be made. These antibodies can be used in the diagnostic assays described herein to identify a subject's predilection to a neurodegenerative disease. The next example describes a similar approach that was used to make an antibody specific for wild-type IRP-2.

## EXAMPLE 2

Antibodies Specific for IRP-2

In this example, an approach that was used to make and screen an antibody specific for IRP-2 is provided. To make the antibody, Balb/c mice were immunized with a 63-residue (wild type) "loop peptide", in RIBI Adjuvant (Corixa) following the manufacturers protocol. Splenocytes from the mice were then fused to Sp2/0 myeloma cells using standard hybridoma techniques. The resulting hybridomas were screened for reactivity with the loop peptide, as well as the whole molecule. Six clones were positive by ELISA (native molecule) and Western Blot (denatured molecule). One of these (4G11) was selected for large scale antibody production, based on it's growth characteristics and strong assay results.

Competitive binding assays were then conducted between 4G11 and the other 5 clones, to determine whether they recognized the same or different epitopes. Only one (14F7) did not significantly inhibit the binding of 4G11, and is assumed to bind at a different site. Thus, 14F7 and 4G11-HRP became the basis for the capture ELISA assay (described below), which can also be used for detection of IRP-2 in biological samples. The assay is sensitive down to 1 :g/mL and shows excellent linearity.

The capture assay was performed as follows. Unlabeled antibody was diluted in carbonate buffer, pH 9.6 (Sigma #C-3041), usually to 1-10 ug/mL. The individual antibody concentration may need to be determined empirically, starting with 10 ug/mL and working downward. It is important not hinder antigen binding by overcrowding and the lowest concentration that will still give a strong signal was selected. The antibodies were then plated, approx. 100 :L per well, in Immulon-1 plates (Dynex #3355), covered with tape (Falcon #3073), and incubated overnight at 4°C.

Subsequently, the plates were warmed to room temp. and the wells were washed 3X with PBS (w/o tween) (Cellgro, #20-031-CV, 10X Concentrate diluted to 1X.) The plates were then blocked with SuperBlock (Pierce #37515), by adding 200 :L to each well, emptying by inversion, and repeating the process for a total of 3X. The wells were then washed 3X with PBS-Tween (PBS + 0.05% Tween-20, Sigma #P-6585). Diluent (control), antigen, and standards (approx. 100:1) were added to the wells. The diluent used was carrier (10% SuperBlock in PBS-Tween). The wells were taped and the reaction was allowed to take place for 1 hr at room temp. (Shaking the plate will greatly increase sensitivity in assays). Subsequently, the wells were washed 3X with PBS-Tween.

Next, approx. 100 :L of an HRP-tagged detection antibody diluted in carrier was added. (The manufacturer's recommendations was followed when a commercial product was used and .the appropriate

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 47 -

dilution of home grown antibodies was empirically determined.) The wells were taped and the reaction was allowed to take place for 1 hr at room temp. (Shaking the plate will greatly increase sensitivity in assays). Subsequently, the wells were washed 3X with PBS-Tween. Then approx. 100 uL substrate (Bio-Rad #172-1067) was added to the wells. The reaction was allowed to take place uncovered for approx. 30 min. and readings at an absorbance at 630 nm, ref. 490 nm were taken. Assay parameters were such that an O.D. of around 2.0 was obtained in about 30 min. incubation for the most concentrated antigen samples in the assay. When scouting out appropriate dilutions of capture antibody, antigen, and detection antibody, it may be helpful to do a "checkerboard" assay. The example below describes an approach that was used to join antiIRP-2 antibodies to beads.

## EXAMPLE 3

## Support-bound IRP-2 Antibodies

This example describes an approach that was used to prepare support-bound IRP-2 antibodies for use in flow cytometry. Approximately, five milligrams of purified, carrier-free (no other proteins), mouse monoclonal antibody directed against IRP-2 was modified with sulfo-SMCC and then was conjugated to 15 mg of r-phycoerythrin modified with 2-iminothiolane. The resultant conjugate was separated from free unconjugated r-phycoerythrin and free unconjugated monoclonal antibody by size exclusion chromatography on Sepharose S-300-HR columns. The procedure required two days to complete. Final yield of usable conjugate was about 50-95% of initial antibody mass with usual anticipated yields of >85%. Successful conjugation was confirmed by capture of conjugate on goat anti-mouse coated 7 micron beads and analysis by flow cytometry.

## EXAMPLE 4

## Preparation of Leukocytes

Mononuclear cells are prepared from heparin anticoagulated peripheral blood samples by density gradient separations using 68% Percoll. Briefly, 20 ml of undiluted whole blood samples are layered onto 25 ml of 68% Percoll in a 50 ml centrifuge tube. The blood is then centrifuged for 20 minutes at 800 x g. The interface cells are collected and pelleted by centrifugation. The cell pellet is disrupted by vortexing and the remnant erythrocytes are removed by lysis using 25 ml of VitaLyse erythrocyte lysing buffer (BioErgonomics). Cells are washed once with 25 ml of PBS and then resuspended to  $1 \times 10^7$  mononuclear cells/ml. One hundred microliters of cells ( $1 \times 10^6$ ) are used for each labeling procedure.

For stimulation of inflammatory cytokine expression, cells are resuspended in either Basal Medium or ActiCyle-LPS medium (BioErgonomics, St. Paul, MN) at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml and incubated for 20 hours at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. During the last 4 hours of incubation, the golgi inhibitor Brefeldin A (10 ng/ml) is added to the cultures to inhibit the secretion of cytokine and enhance the intracellular staining. After the incubation period, cells are harvested and the culture supernatants retained for cytokine secretion analysis. Cells are retained for detection of intracellular cytokines.

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 48 -

Activation of lymphocytes for the detection of altered levels of intracellular IRP-2 protein or induction of apoptosis are performed in the following manner. One million mononuclear cells are resuspended in either Basal Medium or ActiCyle-TC medium (BioErgonomics, St. Paul, MN) and incubated for 48-72 hours at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. ActiCyle-TC medium contains anti-CD3 antibody and the human cytokines Interleukin-1 alpha (IL-1α) and Interleukin-2 (IL-2). This medium specifically activates T-lymphocytes via the epsilon chain of the T-cell antigen receptor and the receptors for the two cytokines.

## EXAMPLE 5

## Fluorochrome-labeled Anti-IRP-2 Antibodies

1. Fluorochrome Labeling of Antibodies

To label antibodies with FITC, antibodies are exchanged into 100 mM KH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer (pH 9.0) at a concentration of 5 mg/ml. FITC (Molecular Probes) (10 mg/ml in DMF) is added to the antibody at a 25:1 molar ration and incubated for 1 hour at room temperature, in the dark. Free FITC is separated from the antibody on a G-25 Sephadex column. Phycoerythrin and Cy5PE conjugates are produced using 2-iminothiolane to modify the fluorochrome and sulfo-SMCC to modify the antibody. The modified proteins are then incubated together for 1 hour at room temperature in the dark. Free fluorochrome and antibody is separated from fluorochrome-conjugated antibody by separation on Sephacryl S-300-HR columns (Sigma). Alterations in the ratio of fluorochrome to protein may be necessary to optimize the fluorescent signal for a particular antibody or peptide antigen.

2. Quality Control of Anti-IRP-2 Antibodies and Fluorochrome-labeled Anti-IRP-2 Antibodies

The antibodies that are developed against the IRP-2 native, mutant peptides and intact proteins are tested for specificity using both antigen-down ELISA and a micro particle-based immunofluorescent assay developed at BioErgonomics, Inc. Biotin-labeled native and mutant peptides or intact IRP-2 proteins are attached to 7 μm diameter avidin-coated polystyrene paramagnetic particles that bind, with high specificity and avidity, biotin-labeled molecules. The newly developed antibodies are tested for specificity against the micro particles coated with the individual various IRP-2 peptides by sandwich assay. IRP-2-specific antibody bound to the antigen-coated particles is detected by subsequent reaction with phycoerythrin-labeled goat anti-mouse Ig antibody. Samples are analyzed by flow cytometry. Antibodies that produce a positive fluorescence signal are considered potentially specific for the native or mutant peptides. Specificity is confirmed by blockade of specific binding and fluorescence of anti-IRP-2 antibody by pre-incubation of cells or antigen-coated particles with the same unlabeled antibody or pre-incubation of labeled antibody with antigen prior to incubation with the cell or antigen-coated micro particle.

Antigen-coated microparticles are used for quality control of the fluorescent conjugation of the previously selected IRP-2 specific antibodies. Optimal labeling of the anti-IRP-2 antibodies with either phycoerythrin or Cy5-phycoerythrin fluorescent dyes which produce optimal signal-to-noise ratios are selected based on binding to antigen-coated micro particles and intracellular labeling of both antigen-positive and

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 49 -

antigen-negative cells populations. Grouping of specificities of antibodies for particular epitopes of the IRP-2 peptides or complete molecules are determined by specific blockade of fluorochrome-labeled antibodies with unlabeled antibodies.

5

## EXAMPLE 6

## Analysis of Peripheral Blood Samples From MCI Patients

Peripheral blood samples will be obtained from MCI patients. Blood assays are performed twice per year at a minimum.

10

**1. Assay for Expression of Surface Membrane Forms of  $\beta$ APP**

The relative expression of cell surface membrane forms of  $\beta$ APP are determined for study subjects by flow cytometric analysis. Briefly, isolated mononuclear cells are stained with the monoclonal antibody 22C11 which is specific for the n-terminus of the  $\beta$ APP (Boehringer Mannheim) for 30 minutes and phycoerythrin-conjugated CD14. After incubation with the antibodies, cells are washed once with PBS to

15

remove unbound antibody and the cells are then analyzed by flow cytometry.

**2. Assay for Expression of Functional Cell Surface Transferrin Receptors**

The relative expression of functional transferrin receptors on cells from test subjects is determined by flow cytometric analysis. Briefly, isolated mononuclear cells are stained with 100 ng of phycoerythrin-conjugated human transferrin (BioE Inc.) for 15 minutes and washed once with PBS to remove unbound conjugate prior to flow cytometric analysis. Expression of functional receptors (that is, receptors actually capable of binding transferrin) is directly proportional to the intensity of fluorescence of the cells.

20

**3. Assay for Expression of Proinflammatory Cytokines by Circulating Leukocytes**

Mononuclear cells ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) are incubated for 20 hours in the presence or absence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) to determine basal and stimulated production of the proinflammatory cytokines Interleukin-1 alpha (IL-1 $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6), and Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- $\alpha$ ). Identification of cytokine producing cells is performed by flow cytometry by analysis of intracellular cytokines. Briefly, cells are fixed and permeabilized as described for the identification of IRP-2 proteins. The cells are labeled with PE- or Cy5PE-labeled antibodies specific for IL-1 $\alpha$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ . The amount of cytokine secreted into the culture media during the 20 hour incubation is measured by a flow cytometric-based quantitative immunofluorescent assay (ImmunoFlow and MultiFlow, BioErgonomics, Inc., St Paul, MN).

25

30

**4. Assay for Detection of Apoptosis or Necrosis in Activated Mononuclear Cells**

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 50 -

Briefly, one million mononuclear cells activated by ActiCyte-TC are washed with PBS and stained with the phosphatidylserine binding protein Annexin-V-FITC (200 ng, Caltag, South San Francisco, CA) and the DNA-intercalating dye Propidium Iodide (4 ug). Cells that are positive for Annexin-V alone or Annexin-V and Propidium Iodide are considered as early or late-stage apoptotic, respectively, while cells that are positive for Propidium Iodide alone are considered necrotic.

#### 5. Assay for Expression of Intracellular IRP-2 Loop Peptides and Identification of IRP-2

##### Expressing Cells

Expression of intracellular IRP-2 loop peptide is determined by flow cytometric analysis using FITC, PE and Cy5PE-conjugated anti-IRP-2 monoclonal antibodies to identify cells expressing the native IRP-2 proteins. Experiments are projected to search for IRP-2 iron degradation domain polymorphism. Washed cells ( $1 \times 10^6$  in 100  $\mu$ l of PBS) are fixed by incubation in 1 ml of 1% formaldehyde for 30 minutes expression by specific binding of fluorescently-labeled antibodies directed against intracellular IRP-2 proteins. Positive fluorescence and identification of specificity for a particular anti-IRP-2 antibody is determined by a shift in fluorescence intensity that can be specifically competed by preincubation with antigen or unlabeled antibody. Cells positive for a particular anti-CD antibody is determined by a comparison to similarly-labeled isotypic control antibody or cells whose fluorescent staining was specifically-blocked by unlabeled antibody.

#### 6. Correlation of Flow Cytometric Data and Patient's Clinical Status

The flow cytometric data is correlated with the clinical status of the patient in a separate filing system with a data sheet for each patient. The results of the IRP-2 "loop peptide" degradation screen is analyzed in the MCI subject group using analysis of variance (ANOVA). Data comparing mutated IRP-2 peptide in the two population cohorts (AD and elderly control) may further be examined. Although the invention has been described with reference to embodiments and examples, it should be understood that various modifications can be made without departing from the spirit of the invention. Accordingly, the invention is limited only by the following claims. All references cited herein are hereby expressly incorporated by reference.

WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 51 -

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A purified or isolated nucleic acid comprising a sequence that encodes a peptide loop corresponding to amino acid residues 136-216 of wild-type IRP-2 from humans, wherein said sequence comprises a mutation in said peptide loop, wherein said mutation interferes with the ability of a cysteine residue present in said peptide loop to undergo oxidation.
2. The purified or isolated nucleic acid of Claim 1, wherein said nucleic acid sequence comprises at least one of **SEQ. ID Nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, and 15.**
3. The purified or isolated nucleic acid of Claim 1, wherein said nucleic acid sequence encodes a peptide comprising a sequence selected from the group consisting of **SEQ. ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16.**
4. A purified or isolated polypeptide comprising a peptide loop corresponding to amino acid residues 136-216 of wild-type IRP-2 from humans, wherein said sequence comprises a mutation in said peptide loop, wherein said mutation interferes with the ability of a cysteine residue present in said peptide loop to undergo oxidation.
5. The purified or isolated polypeptide of Claim 4, wherein said IRP-2 protein comprises a sequence selected from the group consisting of **SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16.**
6. The purified or isolated polypeptide of Claim 4, wherein said IRP-2 protein is selected from the group consisting of **SEQ. ID. Nos. SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16.**
7. A method of identifying a subject in need of treatment or prevention of a neurodegenerative disease comprising:
  - obtaining a biological sample from said subject having polynucleotides or protein;
  - providing a probe, said probe being selected from the group consisting of a probe that interacts with a wild type or mutant IRP-2 protein and a probe that interacts with a polynucleotide encoding a wild type or mutant IRP-2 protein;
  - contacting the biological sample with the probe under conditions that allow the probe to interact with the polynucleotide or protein in the biological sample;
  - detecting the amount of probe that interacts with the polynucleotide or protein in the biological sample; and
  - identifying the subject as a subject in need of treatment or prevention of neurodegenerative disease by determining the presence or absence of the probe with the polynucleotide or protein in the biological sample.
8. The method of Claim 7, wherein the probe is selected from the group consisting of a nucleic acid, a protein, and a peptidomimetic.
9. The method of Claim 7, wherein the detection of the amount of probe that interacts with the polynucleotide or protein comprises use of a technique selected from the group consisting of fluorescence-activated cell sorting (FACS), immunoprecipitation, Western blot, immunochromatography, antibody staining, and a hybridization assay.



WO 02/12284

PCT/US01/24747

- 52 -

10. The method of Claim 7, wherein the neurodegenerative disease is Alzheimer's disease.
11. A method of making a probe for the diagnosis of a neurodegenerative disease comprising:  
providing a polypeptide according to Claim 4; and  
generating an antibody that binds to an epitope present on said mutant polypeptide, wherein said  
5 antibody does not cross react with a wild-type IRP-2 protein or fragment thereof.
12. The method of Claim 11, wherein said mutant comprises a substitution or a deletion of a  
cysteine residue.
13. The method of Claim 11, wherein the generating step comprises culturing cells which  
produce said antibody.
- 10 14. An antibody capable of specifically binding to a protein comprising an amino acid sequence  
selected from the group consisting of **SEQ ID Nos. 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16.**
- 15 15. The antibody of Claim 13, wherein said antibody specifically binds to a polypeptide comprising  
at least 10 consecutive amino acids of said protein and said protein has a mutation of a cysteine residue.
16. The antibody of Claim 13, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
- 15 17. A purified or isolated antibody capable of specifically binding a mutant IRP-2 protein but  
does not specifically bind wild-type IRP-2 protein, wherein said mutant IRP-2 protein comprises a mutation in  
a peptide loop that corresponds to the amino acid sequence of **SEQ. ID. No. 2.**
18. The method of Claim 7, wherein the identification of the subject as a subject in need of  
treatment or prevention of neurodegenerative disease comprises determining whether the probe interacts with  
20 the polynucleotide or protein in the biological sample.
19. A method of differentiating mild cognitive impairment syndrome (MCI) from other forms of  
dementia in a human patient, comprising:  
conducting magnetic resonance imaging (MRI) on the patient to quantitate and/or monitor  
brain iron;  
25 wherein abnormal levels or distribution of brain iron indicate the presence of MCI.

WO 02/12284

PCT/US01/24747

## SEQUENCE LISTING

<110> Loma Linda University

<120> IRON-REGULATING PROTEIN-2 (IRP-2) IS  
DIAGNOSTIC FOR NEURODEGENERATIVE DISEASE

<130> LOMAD.140PR

<160> 20

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1  
<211> 189  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> cloning oligonucleotide

<400> 1  
gcaatcacaga atgcacccaaa tcttggaggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctotct 60  
ccacttaag tgcagcctaa gaagcttccc tgcagaggcc agactacctg ccgaggatct 120  
tgtgattctg gagaactagg ccgaaactca ggaacatttt ctgcagagt tgagaataca 180  
cccatcctg 189

<210> 2  
<211> 63  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> peptide for antibody production

<400> 2  
Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala  
1 5 10 15  
Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Cys Arg  
20 25 30  
Gly Gln Thr Thr Cys Arg Gly Ser Cys Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg  
35 40 45  
Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu  
50 55 60

<210> 3  
<211> 189  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> cloning oligonucleotide

<400> 3

WO 02/12284

PCT/US01/24747

gcaatacaga atgcacccaaa tcttgagggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctctct 60  
 ccacttaag tgcagcctaa gaagcttccc gccagaggcc agactacctg ccgaggatct 120  
 tgtgattctg gagaactagg ccgaaactca ggaacatttt cttcgagat tgagaatata 180  
 cccatcctg 189

<210> 4  
 <211> 63  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> peptide for antibody production

<400> 4  
 Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Cys Arg  
 20 25 30  
 Gly Gln Thr Thr Cys Arg Gly Ser Cys Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg  
 35 40 45  
 Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu  
 50 55 60

<210> 5  
 <211> 189  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> cloning oligonucleotide

<400> 5  
 gcaatacaga atgcacccaaa tcttgagggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctctct 60  
 ccacttaag tgcagcctaa gaagcttccc tgcagaggcc agactacctg ccgaggatct 120  
 tgtgattctg gagaactagg ccgaaactca ggaacatttt cttcgagat tgagaatata 180  
 cccatcctg 189

<210> 6  
 <211> 63  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> peptide for antibody production

<400> 6  
 Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Cys Arg  
 20 25 30  
 Gly Gln Thr Thr Ala Arg Gly Ser Cys Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg  
 35 40 45  
 Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu  
 50 55 60

WO 02/12284

PCT/US01/24747

<210> 7  
 <211> 189  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> cloning oligonucleotide

<400> 7  
 gcaatacaga atgcacaaaa tcttgagggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctctct 60  
 ccaactaaag tgcagcctaa gaagcttccc tgcagaggcc agactacctg ccgaggatct 120  
 gctgattctg gagaactagg ccgaaactca ggaacatttt cttcgagat tgagaataca 180  
 cccatcctg 189

<210> 8  
 <211> 63  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> peptide for antibody production

<400> 8  
 Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Cys Arg  
 20 25 30  
 Gly Gln Thr Thr Cys Arg Gly Ser Ala Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg  
 35 40 45  
 Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu  
 50 55 60

<210> 9  
 <211> 189  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> cloning oligonucleotide

<400> 9  
 gcaatacaga atgcacaaaa tcttgagggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctctct 60  
 ccaactaaag tgcagcctaa gaagcttccc gccagaggcc agactaccgc ccgaggatct 120  
 tgtgattctg gagaactagg ccgaaactca ggaacatttt cttcgagat tgagaataca 180  
 cccatcctg 189

<210> 10  
 <211> 63  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> peptide for antibody production

<400> 10  
 Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala

WO 02/12284

PCT/US01/24747

```

1           5           10           15
Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Ala Arg
20           25           30
Gly Gln Thr Thr Ala Arg Gly Ser Cys Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg
35           40           45
Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu
50           55           60

```

<210> 11  
 <211> 189  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> cloning oligonucleotide

```

<400> 11
gcaatacaga atgcacacaa tcttgaggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctctct 60
ccacttaag tgcagcctaa gaagcttccc tgcagaggcc agactacgc ccgaggatct 120
gtgatctctg gagaactagg ccgaactca ggaacatttt ctgcgcagat tgagaatata 180
ccatcctctg                                     189

```

<210> 12  
 <211> 63  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> peptide for antibody production

```

<400> 12
Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala
1           5           10           15
Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Cys Arg
20           25           30
Gly Gln Thr Thr Ala Arg Gly Ser Ala Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg
35           40           45
Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu
50           55           60

```

<210> 13  
 <211> 189  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> cloning oligonucleotide

```

<400> 13
gcaatacaga atgcacacaa tcttgaggt ggtgacctgc agaaagcagg aaagctctct 60
ccacttaag tgcagcctaa gaagcttccc gccagaggcc agactacctg ccgaggatct 120
gtgatctctg gagaactagg ccgaactca ggaacatttt ctgcgcagat tgagaatata 180
ccatcctctg                                     189

```

<210> 14

WO 02/12284

PCT/US01/24747

<211> 63  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> peptide for antibody production

<400> 14  
 Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Ala Arg  
 20 25 30  
 Gly Gln Thr Thr Cys Arg Gly Ser Ala Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg  
 35 40 45  
 Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu  
 50 55 60

<210> 15  
 <211> 189  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> cloning oligonucleotide

<400> 15  
 gcataacaga atgcacacaaa tctctggaggt ggtgacctgc agaaagcagc aaagctctct 60  
 ccacttaag tgcagcctaa gaagcttccc gccagaggcc agactaccgc cggaggatct 120  
 gctgattctg gagaactagg ccgaaactca ggaacatttt ctgcgcagat tgagaataca 180  
 cccatcctg 189

<210> 16  
 <211> 63  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> peptide for antibody production

<400> 16  
 Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Lys Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Ala Arg  
 20 25 30  
 Gly Gln Thr Thr Ala Arg Gly Ser Ala Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg  
 35 40 45  
 Asn Ser Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu  
 50 55 60

<210> 17  
 <211> 2867  
 <212> DNA  
 <213> Homo Sapiens

<400> 17

WO 02/12284

PCT/US01/24747

```

taccttattg aaacattaaa tgacagtcca cataagaagt tottcgatgt atctaaactt 60
ggcaccgaagt atgagtgtct gcttactcca atacgggtct tgttgaagc tgotgtacga 120
aatttgtgatg gctttttaat gaagaaggaa gatgttatga acatttttaga ctggaaaacc 180
aaacaaagca atgttgaagt gcccttttcc cctgcccggt ttcttcttca agattttact 240
ggaataccag caatgggtga ttttgotgct atgaggaggc cagtgaaac tcttggaggt 300
gatcctgaga aagtccatcc tgcctgtccg acagatctta cagtggacca ttctttacaa 360
attgacttca gtaaatgtgc aatacagaat gcaccaaacc ctggagggtg tgacctgcag 420
aaagcaggaa agctctctcc acttaaaagt cagcctaaga agcttccctg caggagccag 480
actacctgcc gaggatcttg tgattctgga gaactaggcc gaaactcagg aacattttct 540
tcgcagcttg agaatacacc catcctgtgt ccttttcatt tgcaaccagt gctgaacct 600
gaacagtggt taaaaaatca agaagttaga ttccgcagaa atcgagagag gcttcagttt 660
tttaagtggg gttcaagagt tttaaaagat ttggcagtg tccctcctgg aactggaatg 720
gtccatcaaa taaacttaga atatttgta agagtgttt ttgaagaaaa agacctccto 780
ttccagaca gtgtagtccg cacagattca cacataacga tgggtgaatgg tttagggatt 840
ctgggtgggg ggggtggagg catgaaaca gaagcagtta tgcctgtgtc gccagtttct 900
cttactttac cagagggtgg tggatgtgag ttaactgggt catcaaaccc ttttgttaca 960
tccatgatgt ttgttcttgg tattacaagg caactcaggc aagttaggag ggctggaaag 1020
ttttgtgagt tttttggag tggagtttca caattatcta tagttgatcg aactacaata 1080
gcaaacatgt gtccggaata tgggtgtctat ctcagctttt tccctgttga caatgtgaca 1140
ttaaaacatt tagaatacac aggtttttagc aaagccaaac tcgaatcaat ggaacacatc 1200
cttaaaagctg tgaattgtct tgaataagac cagaattctt cagggaaccc tgaatactcc 1260
cagggtgatcc agattaatct gaattcnaaa gticcacttg ttatgggtcc aaaaagacct 1320
cgggtagagag ttgotgtgac agatattgaaa agcgatttcc aggttggctt aaatgaaag 1380
gttggattta aaggcttcca aattgcagct gaaaacaaaa aggtatttgt ctccattcat 1440
tatgaaggaa gtgaataaaa gctgtctcat ggatcagtg tcaitgtgc gtttatcagt 1500
tgtaccasta attgcaatcc atctgtcatg cttgtctcag gtctttttgc taaaaggct 1560
gtgaagctgt gtctgcgtgt taaaccttat ataagaacaa gtittatctc aggcagtggt 1620
atggttacac attacctcag ttcaagtga gttattacat atctaagtaa gcttggattt 1680
gaatcgttg gtatggatg ttcaacttgt gtgggaata cagcaacctt atcagacga 1740
gttttaaatg cagtaaaaca ggggtgattgt gtaccctgtg gtaattttat ctggaaaaa 1800
aattttgaag gtctcttttg tgattgtgtt cgtgcaatt atcttgcctc tccacctta 1860
gtgttagctt atgcatagc aggcacagtg aatagattt tccagacaga accttaggt 1920
actgacccca ccggcaagaa catttacctg catgatattt ggctagtcg agaagaagt 1980
catcgagtga aggaagaaca tgttatacta tccatgttta aagcattaaa agataaaata 2040
gaatgggga ataaacggtg gaattcotta gaagcacggc attcagtttt gtttccatgg 2100
gaactaaagt ctacttatat cagatgccct tcaatttttg ataaacttac caaagagcca 2160
attgcactcc aggtatttga aaatgcccat gtctatttat atttgggaga ctctgtcaca 2220
acagatcata tatcactgc aggaagtatc gctaggaata gtgcgtccgc taagtatttg 2280
acaaacagag gccctaccoc tegtgaatto aactottacg gagctgaag aggtaatgat 2340
gotgtaatga caagaggcac ttttgcaaat atcaagcttt ttaataagtt tattggaaaa 2400
coagctccta aaacaattca ttttccatca ggacagacgc tagatgtatt tgaggctgca 2460
gagctgtacc agaaaagag tatcccaactg attattttag caggaaagaa atatggttca 2520
ggaaactcca gagactgggc tgccaaagga cgttatttac tgggtgtgaa agctgttttg 2580
gccgaaggtt atgaaaaaat acacaaagat catttgattg gaattggcat agctccactt 2640
cagttccttc caggagaaaa tgcagattcc ttgggcctct ccggtagaga aacattttct 2700
ttaacatttc ctgaagaact gtctcctgga attacattga atatacagac aagcaactga 2760
aaagtattca cgtgattgc ttogtttgaa gatgatgtg aaataacatt atacaaacat 2820
ggaggattat taaactttgt ggcacgaaaa ttctcatagt atctact 2867

```

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 952

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 18

Tyr Leu Ile Glu Thr Leu Asn Asp Ser Ser His Lys Lys Phe Phe Asp  
1 5 10 15

WO 02/12284

PCT/US01/24747

Val Ser Lys Leu Gly Thr Lys Tyr Asp Val Leu Pro Tyr Ser Ile Arg  
 20 25 30  
 Val Leu Leu Glu Ala Ala Val Arg Asn Cys Asp Gly Phe Leu Met Lys  
 35 40 45  
 Lys Glu Asp Val Met Asn Ile Leu Asp Trp Lys Thr Lys Gln Ser Asn  
 50 55 60  
 Val Glu Val Pro Phe Phe Pro Ala Arg Val Leu Leu Gln Asp Phe Thr  
 65 70 75 80  
 Gly Ile Pro Ala Met Val Asp Phe Ala Ala Met Arg Glu Ala Val Lys  
 85 90 95  
 Thr Leu Gly Gly Asp Pro Glu Lys Val His Pro Ala Cys Pro Thr Asp  
 100 105 110  
 Leu Thr Val Asp His Ser Leu Gln Ile Asp Phe Ser Lys Cys Ala Ile  
 115 120 125  
 Gln Asn Ala Pro Asn Pro Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala Gly Lys  
 130 135 140  
 Leu Ser Pro Leu Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Cys Arg Gly Gln  
 145 150 155 160  
 Thr Thr Cys Arg Gly Ser Cys Asp Ser Gly Glu Leu Gly Arg Asn Ser  
 165 170 175  
 Gly Thr Phe Ser Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Ile Leu Cys Pro Phe  
 180 185 190  
 His Leu Gln Pro Val Pro Glu Pro Glu Thr Val Leu Lys Asn Gln Glu  
 195 200 205  
 Val Glu Phe Gly Arg Asn Arg Glu Arg Leu Gln Phe Phe Lys Trp Ser  
 210 215 220  
 Ser Arg Val Leu Lys Asn Val Ala Val Ile Pro Pro Gly Thr Gly Met  
 225 230 235 240  
 Ala His Gln Ile Asn Leu Glu Tyr Leu Ser Arg Val Val Phe Glu Glu  
 245 250 255  
 Lys Asp Leu Leu Phe Pro Asp Ser Val Val Gly Thr Asp Ser His Ile  
 260 265 270  
 Thr Met Val Asn Gly Leu Gly Ile Leu Gly Trp Gly Val Gly Gly Ile  
 275 280 285  
 Glu Thr Glu Ala Val Met Leu Gly Leu Pro Val Ser Leu Thr Leu Pro  
 290 295 300  
 Glu Val Val Gly Cys Glu Leu Thr Gly Ser Ser Asn Pro Phe Val Thr  
 305 310 315 320  
 Ser Ile Asp Val Val Leu Gly Ile Thr Lys His Leu Arg Gln Val Gly  
 325 330 335  
 Val Ala Gly Lys Phe Val Glu Phe Phe Gly Ser Gly Val Ser Gln Leu  
 340 345 350  
 Ser Ile Val Asp Arg Thr Thr Ile Ala Asn Met Cys Pro Glu Tyr Gly  
 355 360 365  
 Ala Ile Leu Ser Phe Phe Pro Val Asp Asn Val Thr Leu Lys His Leu  
 370 375 380  
 Glu His Thr Gly Phe Ser Lys Ala Lys Leu Glu Ser Met Glu Thr Tyr  
 385 390 395 400  
 Leu Lys Ala Val Lys Leu Phe Arg Asn Asp Gln Asn Ser Ser Gly Glu  
 405 410 415  
 Pro Glu Tyr Ser Gln Val Ile Gln Ile Asn Leu Asn Ser Ile Val Pro  
 420 425 430  
 Ser Val Ser Gly Pro Lys Arg Pro Arg Asp Arg Val Ala Val Thr Asp  
 435 440 445  
 Met Lys Ser Asp Phe Gln Ala Cys Leu Asn Glu Lys Val Gly Phe Lys  
 450 455 460  
 Gly Phe Gln Ile Ala Ala Glu Lys Gln Lys Asp Ile Val Ser Ile His



WO 02/12284

PCT/US01/24747

```

465          470          475          480
Tyr Glu Gly Ser Glu Tyr Lys Leu Ser His Gly Ser Val Val Ile Ala
Ala Val Ile Ser Cys Thr Asn Asn Cys Asn Pro Ser Val Met Leu Ala
Ala Gly Leu Leu Ala Lys Lys Ala Val Glu Ala Gly Leu Arg Val Lys
Pro Tyr Ile Arg Thr Ser Leu Ser Pro Gly Ser Gly Met Val Thr His
Tyr Leu Ser Ser Ser Gly Val Leu Pro Tyr Leu Ser Lys Leu Gly Phe
Glu Ile Val Gly Tyr Gly Cys Ser Thr Cys Val Gly Asn Thr Ala Pro
Leu Ser Asp Ala Val Leu Asn Ala Val Lys Gln Gly Asp Leu Val Thr
Cys Gly Asn Phe Ile Trp Lys Lys Asn Phe Glu Gly Arg Leu Cys Asp
Cys Val Arg Ala Asn Tyr Leu Ala Ser Pro Pro Leu Val Val Ala Tyr
Ala Ile Ala Gly Thr Val Asn Ile Asp Phe Gln Thr Glu Pro Leu Gly
Thr Asp Pro Thr Gly Lys Asn Ile Tyr Leu His Asp Ile Trp Pro Ser
Arg Glu Glu Val His Arg Val Glu Glu Glu His Val Ile Leu Ser Met
Phe Lys Ala Leu Lys Asp Lys Ile Glu Met Gly Asn Lys Arg Trp Asn
Ser Leu Glu Ala Pro Asp Ser Val Leu Phe Pro Trp Asp Leu Lys Ser
Thr Tyr Ile Arg Cys Pro Ser Phe Phe Asp Lys Leu Thr Lys Glu Pro
Ile Ala Leu Gln Ala Ile Glu Asn Ala His Val Leu Leu Tyr Leu Gly
Asp Ser Val Thr Thr Asp His Ile Ser Pro Ala Gly Ser Ile Ala Arg
Asn Ser Ala Ala Lys Tyr Leu Thr Asn Arg Gly Leu Thr Pro Arg
Glu Phe Asn Ser Tyr Gly Ala Arg Arg Gly Asn Asp Ala Val Met Thr
Arg Gly Thr Phe Ala Asn Ile Lys Leu Phe Asn Lys Phe Ile Gly Lys
Pro Ala Pro Lys Thr Ile His Phe Pro Ser Gly Gln Thr Leu Asp Val
Phe Glu Ala Ala Glu Leu Tyr Gln Lys Glu Gly Ile Pro Leu Ile Ile
Leu Ala Gly Lys Lys Tyr Gly Ser Gly Asn Ser Arg Asp Trp Ala Ala
Lys Gly Pro Tyr Leu Leu Gly Val Lys Ala Val Leu Ala Glu Ser Tyr
Glu Lys Ile His Lys Asp His Leu Ile Gly Ile Gly Ile Ala Pro Leu
Gln Phe Leu Pro Gly Glu Asn Ala Asp Ser Leu Gly Leu Ser Gly Arg
Glu Thr Phe Ser Leu Thr Phe Pro Glu Glu Leu Ser Pro Gly Ile Thr
Leu Asn Ile Gln Thr Ser Thr Gly Lys Val Phe Ser Val Ile Ala Ser

```

WO 02/12284

PCT/US01/24747

Phe Glu Asp Val Glu Ile Thr Leu Tyr Lys His Gly Gly Leu Leu  
 930 935 940  
 Asn Phe Val Ala Arg Lys Phe Ser  
 945 950

<210> 19  
 <211> 3770  
 <212> DNA  
 <213> Rattus Norvegicus

<400> 19  
 tgaggcggc gatggactcc ccaagtgcag gatacacctt tgagtacctt attgaaacat 60  
 taaatggcag ttacacagaag aagttcttca atgtacctaa acttggaggg accaagtatg 120  
 atattctgcc ttactcaata cgggtctctat tgggaagctgc tgtacgaatc tggtagggat 180  
 ttttaaatgaa aaaggaagat gttataaata ttttggactg gaaaaccaaa caaagcaatg 240  
 ttgaagtgc ctttttccccc gcccggtgtg ttcttcaaga ttccactgga ataccggcaa 300  
 tggtaggatt tgcgtctatg agggaggcaca tgaaaactct tggagggtgat cctaagaaag 360  
 tccaccctgc ctgtccaaca gatctcacag ttgaccactc ttacagatt gacttcagta 420  
 aatgtgcaat acagaatgca ccaactcctg gaggtgtgga cctacagaaa gcaggaaagc 480  
 tctctccact taaagtacag cctaagaagc ttccatgtcg aggcagact acctgccggg 540  
 gatcgtgtga ttctggagaa ctaagccgaa actcaggaac attttctcg cagattgaga 600  
 ataagcctgt cctgtgtccc ttctatttgc aaccagtgc tgaacctgag acggtgttaa 660  
 aaatcaagga agtagaattt ggcagaatc gagagaggct tcaattttc aagtgagact 720  
 caggagcttt taagaatgtg gcagtcactc ctcccgaaac tggatggct catcaagtga 780  
 acttagaaca ttgttcgaga gtatgttttg aagaagccga cctgctctc ccagacagcg 840  
 taattggcac agattctcat ataaccatgg tgaatggatt ggaattctt gggtggggag 900  
 ttggaagcat tgagacagag gcagttatgc ttggcctgcc agttactctt actttaccag 960  
 aggtggttgg atgtgagcta actgggtcat ccaatgcttt tgttacctcc atagatattg 1020  
 tccataggcat tacaagacac ctccaggcaag taggcgtggc tggaaagtgt gttgagtctt 1080  
 ttggaagtgg agtttccaaa ttatctattg tcatagaaac tactatagca aacatgtgtc 1140  
 ccgagtatgg tgctatctcc agctttttcc ctgttgacaa tgtgacacta cgcactttag 1200  
 aacatacagg ttttgacaaa accaaacttg agtcaatgga agaatacctt aaagctgtga 1260  
 aattgtttcg aaatgatgag aattcttcag aaactgaata ttctcaggtg atacagatta 1320  
 atctgaattc aatagttgca tctgtcagtg gtccaaaaag gcctcaggtg agagttgctg 1380  
 taacagatat gaaaagtgat ttccagcctt gcttaaatga aaaggttggg tttaaaggct 1440  
 tccaagtggc agcagaaxaa caaagtata ctgtctcagt tegtattgat ggaagtga 1500  
 ataagctgtc ccatgggtgc gtgtcatttg ctgcggttat cagctgtacc aataactgca 1560  
 atccatcagt gatgtctcgt gcaggtcttt tggctaaaaa ggctgttga actggtctac 1620  
 gagttaaac ttatataaga acaagtttgt ctccaggcag tgggattgtt acacattacc 1680  
 tcagtccaag tggagtggtt cctacactta gcaagctagg gtttgaata gttggctatg 1740  
 gatgtccaac gtgtgttaga aatacagcac ctttatcaga agcaattttg aatgcagtaa 1800  
 aacagggtga tttggctacc tgtggagttt tatctggaaa caaaaatttc gaaggtcgtc 1860  
 tttgtgatg tgctcgtgct aattatctcg cctctccacc cttagtgtg gottacgcca 1920  
 tagcaggcac agtgaatata gatttccaga cagagccatt aggtactgac totacaggca 1980  
 agaacattta cctgcattgc atttggccta gtcagagaaga agttcatcag atagaagaag 2040  
 aacatgttat ttgtccatg tttaagcac tgaagagaga agtagagatg ggaataaac 2100  
 gytggaattc cttagacgct ccagattcag tgttgtttcc atgggattgt aagtctactt 2160  
 acatcagatg cccttcattt ttgtataaac ttaccasaga accagctgca tccagccta 2220  
 ttgaaatgc ccatgtcctg ttgtacttgg gagactctgt cactacagac cacatatcac 2280  
 ctgctgggaag cattgctagg agcagagctg ctgctaagta cttgacaaac agaggcctta 2340  
 ctcccggaga gttcaactct tatggagctc gaagaggtta tgaatgctgt atgacaagag 2400  
 gcacgtttgc aaacatcaag ctttttaata agtttatttg gaagccagct cccaaaaaaa 2460  
 ttcatttttc atcaggacag acgctcgatg tatttgaagc tgcagaatta tccaaaaaaa 2520  
 aaggtatccc actgataatt tttagcaggaa aaaaatatgg ttacaggaaat tcaagagact 2580  
 gggctgcgaa aggaccctat ttgctgggtg taaaggtctt tttggctgaa agctatgaaa 2640  
 agatcacaaa agatcatttg attggaattg gtatagcacc acttgagttc ctcccaggag 2700

WO 02/12284

PCT/US01/24747

```

aaaatgcaga ttcttgggc ctctcggca gagaagtatt ttctttatca ttctctgaag 2760
aactctttcc tggaaattacg ttaaatataa agacagagac tggcaaaagag ttccagcgtga 2820
ttgcagcatt tgaataatgat gtggagataa ctttgtacaa acatggaggga ttgttaaaact 2880
ttgtggotcg aaaattctta tagtatctac tccccatggt atctttcatg gctggtaact 2940
gcaaaagcctt ctctgtgctt ggacccagga atcattgccca tggaaactgca gatgatttca 3000
gtataactctt ctctccatg gatgtaaatg ataacgaatc aacgtagtga ctaaaatgaa 3060
atcttgattt taataaatat acgaatgggt ctattaacat tgctaaaaat aacgtgtgaa 3120
gggtgtgtgt ggaagagacc tgaagtatg gggggtatat ttatgagaa cattttgtaa 3180
ataaagacag aatttgaact tgtgttgaag attcatatga atagccgttc taaagctgtt 3240
tgtttttgtt tgaaccttaa aactggacta ctgtttgttg gtttaagaat agcaagtga 3300
tttagaagaa gccagactag atcctaataa tatggaatg ggtacotgat ttagaatatga 3360
atttttaaat gtttttcttt ccagaattga attggacaca attggcattt ccagtttga 3420
atgtaagtca ggtttggcct tagtctcaat acatctgcaa gccatagaac ctgccccaga 3480
tcacagtccc tctgaccagc caaaatgtcc tccatgtctg cagataaatg actgtaaaat 3540
acagctgatt gtgtggtagc gtgtattagt aagaatatat ttctgtgtgt atagccctgt 3600
aattttttca gtaacttgcc actatgaccc actcacaagc ccaataacgg tgtattaatt 3660
tggactagat ttgtctcatt ttacatgact gtaactcctg taacctcaat taggaatcac 3720
tagctgacat tccacactcc ttttatgact gctggaaaca attgagtcaa 3770

```

<210> 20  
 <211> 963  
 <212> PRT  
 <213> Rattus Norvegicus

<400> 20  
 Met Asp Ser Pro Ser Ala Gly Tyr Thr Phe Glu Tyr Leu Ile Glu Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Asn Gly Ser Ser Gln Lys Lys Phe Phe Asn Val Pro Lys Leu Gly  
 20 25 30  
 Gly Thr Lys Tyr Asp Ile Leu Pro Tyr Ser Ile Arg Val Leu Leu Glu  
 35 40 45  
 Ala Ala Val Arg Asn Cys Asp Gly Phe Leu Met Lys Lys Glu Asp Val  
 50 55 60  
 Ile Asn Ile Leu Asp Trp Lys Thr Lys Gln Ser Asn Val Glu Val Pro  
 65 70 75 80  
 Phe Phe Pro Ala Arg Val Val Leu Gln Asp Phe Thr Gly Ile Pro Ala  
 85 90 95  
 Met Val Asp Phe Ala Ala Met Arg Glu Ala Met Lys Thr Leu Gly Gly  
 100 105 110  
 Asp Pro Lys Lys Val His Pro Ala Cys Pro Thr Asp Leu Thr Val Asp  
 115 120 125  
 His Ser Leu Gln Ile Asp Phe Ser Lys Cys Ala Ile Gln Asn Ala Pro  
 130 135 140  
 Asn Pro Gly Gly Gly Asp Leu Gln Lys Ala Gly Lys Leu Ser Pro Leu  
 145 150 155 160  
 Lys Val Gln Pro Lys Lys Leu Pro Cys Arg Gly Gln Thr Thr Cys Arg  
 165 170 175  
 Gly Ser Cys Asp Ser Gly Glu Leu Ser Arg Asn Ser Gly Thr Phe Ser  
 180 185 190  
 Ser Gln Ile Glu Asn Thr Pro Val Leu Cys Pro Phe His Leu Gln Pro  
 195 200 205  
 Val Pro Glu Pro Glu Thr Val Leu Lys Asn Gln Glu Val Glu Phe Gly  
 210 215 220  
 Arg Asn Arg Glu Arg Leu Gln Phe Phe Lys Trp Ser Ser Gly Ala Phe  
 225 230 235 240  
 Lys Asn Val Ala Val Ile Pro Pro Gly Thr Gly Met Ala His Gln Val  
 245 250 255

WO 02/12284

PCT/US01/24747

```

Asn Leu Glu His Leu Ser Arg Val Val Phe Glu Glu Ala Asp Leu Leu
260 265 270
Phe Pro Asp Ser Val Ile Gly Thr Asp Ser His Ile Thr Met Val Asn
275 280 285
Gly Leu Gly Ile Leu Gly Trp Gly Val Gly Gly Ile Glu Thr Glu Ala
290 295 300
Val Met Leu Gly Leu Pro Val Thr Leu Thr Leu Pro Glu Val Val Gly
305 310 315 320
Cys Glu Leu Thr Gly Ser Ser Asn Ala Phe Val Thr Ser Ile Asp Ile
325 330 335
Val Leu Gly Ile Thr Lys His Leu Arg Gln Val Gly Val Ala Gly Lys
340 345 350
Phe Val Glu Phe Phe Gly Ser Gly Val Ser Gln Leu Ser Ile Val Asp
355 360 365
Arg Thr Thr Ile Ala Asn Met Cys Pro Glu Tyr Gly Ala Ile Leu Ser
370 375 380
Phe Phe Pro Val Asp Asn Val Thr Leu Arg His Leu Glu His Thr Gly
385 390 395 400
Phe Asp Lys Thr Lys Leu Glu Ser Met Glu Glu Tyr Leu Lys Ala Val
405 410 415
Lys Leu Phe Arg Asn Asp Glu Asn Ser Ser Glu Pro Glu Tyr Ser Gln
420 425 430
Val Ile Gln Ile Asn Leu Asn Ser Ile Val Ala Ser Val Ser Gly Pro
435 440 445
Lys Arg Pro Gln Asp Arg Val Ala Val Thr Asp Met Lys Ser Asp Phe
450 455 460
Gln Ala Cys Leu Asn Glu Lys Val Gly Phe Lys Gly Phe Gln Val Ala
465 470 475 480
Ala Glu Lys Gln Ser Asp Thr Val Ser Val Arg Tyr Asp Gly Ser Glu
485 490 495
Tyr Lys Leu Ser His Gly Ser Val Val Ile Ala Ala Val Ile Ser Cys
500 505 510
Thr Asn Asn Cys Asn Pro Ser Val Met Leu Ala Ala Gly Leu Leu Ala
515 520 525
Lys Lys Ala Val Glu Thr Gly Leu Arg Val Lys Pro Tyr Ile Arg Thr
530 535 540
Ser Leu Ser Pro Gly Ser Gly Met Val Thr His Tyr Leu Ser Ser Ser
545 550 555 560
Gly Val Leu Pro Tyr Leu Ser Lys Leu Gly Phe Glu Ile Val Gly Tyr
565 570 575
Gly Cys Ser Thr Cys Val Gly Asn Thr Ala Pro Leu Ser Glu Ala Ile
580 585 590
Leu Asn Ala Val Lys Gln Gly Asp Leu Ala Thr Cys Gly Val Leu Ser
595 600 605
Gly Asn Lys Asn Phe Glu Gly Arg Leu Cys Asp Cys Val Arg Ala Asn
610 615 620
Tyr Leu Ala Ser Pro Pro Leu Val Val Ala Tyr Ala Ile Ala Gly Thr
625 630 635 640
Val Asn Ile Asp Phe Gln Thr Glu Pro Leu Gly Thr Asp Ser Thr Gly
645 650 655
Lys Asn Ile Tyr Leu His Asp Ile Trp Pro Ser Arg Glu Glu Val His
660 665 670
Gln Ile Glu Glu Glu His Val Ile Leu Ser Met Phe Lys Ala Leu Lys
675 680 685
Glu Lys Val Glu Met Gly Asn Lys Arg Trp Asn Ser Leu Asp Ala Pro
690 695 700
Asp Ser Val Leu Phe Pro Trp Asp Val Lys Ser Thr Tyr Ile Arg Cys

```

WO 02/12284

PCT/US01/24747

```

705          710          715          720
Pro Ser Phe Phe Asp Lys Leu Thr Lys Glu Pro Ala Ala Ser Gln Pro
          725          730          735
Ile Glu Asn Ala His Val Leu Leu Tyr Leu Gly Asp Ser Val Thr Thr
          740          745          750
Asp His Ile Ser Pro Ala Gly Ser Ile Ala Arg Ser Arg Ala Ala Ala
          755          760          765
Lys Tyr Leu Thr Asn Arg Gly Leu Thr Pro Arg Glu Phe Asn Ser Tyr
          770          775          780
Gly Ala Arg Arg Gly Asn Asp Ala Val Met Thr Arg Gly Thr Phe Ala
          785          790          795
Asn Ile Lys Leu Phe Asn Lys Phe Ile Gly Lys Pro Ala Pro Lys Thr
          800          805          810
Ile His Phe Pro Ser Gly Gln Thr Leu Asp Val Phe Glu Ala Ala Glu
          815          820          825
Leu Tyr Gln Lys Glu Gly Ile Pro Leu Ile Ile Leu Ala Gly Lys Lys
          830          835          840
Tyr Gly Ser Gly Asn Ser Arg Asp Trp Ala Ala Lys Gly Pro Tyr Leu
          845          850          855
Leu Gly Val Lys Ala Val Leu Ala Glu Ser Tyr Glu Lys Ile His Lys
          860          865          870
Asp His Leu Ile Gly Ile Gly Ile Ala Pro Leu Glu Phe Leu Pro Gly
          875          880          885
Glu Asn Ala Asp Ser Leu Gly Leu Ser Gly Arg Glu Val Phe Ser Leu
          890          900          905
Ser Phe Pro Glu Glu Leu Phe Pro Gly Ile Thr Leu Asn Ile Lys Thr
          910          915          920
Ser Thr Gly Lys Glu Phe Ser Val Ile Ala Ala Phe Glu Asn Asp Val
          925          930          935
Glu Ile Thr Leu Tyr Lys His Gly Gly Leu Leu Asn Phe Val Ala Arg
          940          945          950
Lys Phe Leu
          955          960

```

2

1

1

1

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
14 February 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/012284 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/47
- (21) International Application Number: PCT/US01/24747
- (22) International Filing Date: 6 August 2001 (06.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/222,863 4 August 2000 (04.08.2000) US
- (71) Applicants: LOMA LINDA UNIVERSITY MEDICAL CENTER [US/US]; Coleman Pavilion, 11176 Campus Street, Suite #A1116, Loma Linda, CA 92350 (US); THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, as represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES [US/US]; National Institutes of Health, Office of Technology Transfer, Suite 325, 6011 Executive Boulevard, Rockville, MD 20852-3804 (US).
- (72) Inventors: KIRSCH, Wolff, M.; 1360 Prospect Drive, Redlands, CA 92373 (US); LENNART, Anton; 11872 Cardinal Court, Loma Linda, CA 92354 (US); KELLN, Wayne, J.; 25232 Lawton Avenue, Loma Linda, CA 92354 (US); KANG, Dae-Kyung; 257 Congressional Lane #613, Rockville, MD 20852 (US); LEVINE, Rodney, L.; 1502 Auburn Avenue, Rockville, MD 20850 (US); ROUALT, Tracey, A.; 7009 Tilden Lane, North Bethesda, MD 20852 (US).
- (74) Agent: ALTMAN, Daniel, E.; Knobbe, Martens, Olson & Bear, T.J.P. 620 Newport Center Drive, Sixteenth Floor, Newport Beach, CA 92660 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SI, SK (utility model), SK, SI, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report  
— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau
- (88) Date of publication of the international search report: 21 August 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/012284 A3

(54) Title: IRON REGULATING PROTEIN-2 (IRP-2) AS A DIAGNOSTIC FOR NEURODEGENERATIVE DISEASE

(57) Abstract: The present invention relates to the discovery of markers for neurodegenerative disease. More particularly, it was discovered that forms of IRP-2 protein that are unable to undergo oxidation at critical cysteine residues are diagnostic for neurodegenerative disease including, but not limited to, Alzheimer's Disease (AD). Embodiments include nucleic acids that encode mutant IRP-2 proteins and fragments thereof, mutant IRP-2 proteins and fragments thereof, antibodies directed to epitopes present on mutant IRP-2 proteins and fragments thereof, methods of making these nucleic acids and polypeptides, as well as, approaches to diagnose neurodegenerative disease in animals, such as humans at risk of contracting AD or mild cognitive impairment syndrome (MCI). The level or distribution of iron in a human brain, as determined by magnetic resonance imaging (MRI), can be used to diagnose AD and/or MCI.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Item: International Application No. PC1/US 01/24747
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/12 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SMITH MARK A ET AL: "Abnormal localization of iron regulatory protein in Alzheimer's disease." BRAIN RESEARCH, vol. 788, no. 1-2, 30 March 1998 (1998-03-30), pages 232-236, XP002199939 ISSN: 0006-8993 cited in the application the whole document ----- -/-	7-10, 18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 May 2002		Date of mailing of the international search report 13/06/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3916		Authorized officer Smalt, R

Form PCT/ISA/E10 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/24747
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	KANG, DAE-KYUNG; DRAKE, STEVEN K.; ROUAULT, TRACEY A.; LEVINE, RODNEY L.: "Molecular mechanism of oxidative modification of iron regulatory protein 2." FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE, vol. 29, no. Suppl. 1, - November 2000 (2000-11) pages S82-Abstr.249, XP001075078 7th Annual Meeting of the Oxygen Society, San Diego, CA, USA November 16-20, 2000 the whole document ---	1-6
T	GALASKO D: "New approaches to diagnose and treat Alzheimer's disease: a glimpse of the future." CLINICS IN GERIATRIC MEDICINE. UNITED STATES MAY 2001, vol. 17, no. 2, May 2001 (2001-05), pages 393-410, XP008003694 ISSN: 0749-0690 page 404, paragraph 3 -----	



## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(71)出願人 303020761

ザ ガバメント オブ ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ,アズ リプレゼンテッド  
バイ ザ セクレタリー, デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービス  
アメリカ合衆国 メリーランド州 20852-3804, ロックビル, エグゼキュティブ  
ボールバード 6011, スイート 325, オフィス オブ テクノロジー トランスファー,  
ナショナル インスティテューツ オブ ヘルス

(74)代理人 100065215

弁理士 三枝 英二

(74)代理人 100076510

弁理士 掛樋 悠路

(74)代理人 100086427

弁理士 小原 健志

(74)代理人 100090066

弁理士 中川 博司

(74)代理人 100094101

弁理士 舘 泰光

(74)代理人 100099988

弁理士 斎藤 健治

(74)代理人 100105821

弁理士 藤井 淳

(74)代理人 100099911

弁理士 関 仁士

(74)代理人 100108084

弁理士 中野 睦子

(72)発明者 キルシュ ボルフ エム.

アメリカ合衆国 92373 カリフォルニア州 レッドランズ プロスペクト ドライブ 13  
60

(72)発明者 レナート アントン

アメリカ合衆国 92354 カリフォルニア州 ローマ リンダ カーディナル コート 11  
872

(72)発明者 ケルン ウェイン ジェイ.

アメリカ合衆国 92354 カリフォルニア州 ローマ リンダ ロートン アベニュー 25  
232

(72)発明者 カング デア - クヤング

アメリカ合衆国 20852 メリーランド州 ロックビル コングレッションナル レーン #6  
13 257

(72)発明者 レビン ロドニー エル.

アメリカ合衆国 20850 メリーランド州 ロックビル アーバン アベニュー 1502

(72)発明者 ローアルト トレーシー エー

アメリカ合衆国 メリーランド州 20852 ノース ベセズダ ティルデン レーン 700  
9

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 BA80 CA02 CA09 CA12 DA06 GA03 GA11  
GA25 HA13 HA14 HA15  
4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ43 QQ53 QQ79 QR32 QR36 QR40 QR48  
QR56 QS33 QS34 QX02  
4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA21 EA50  
FA71 FA72 FA74